HISTOMORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON ÖSTROGEN BEIM TRANSPLANTABLEN OSTEOSARKOM DER MAUS

Franz Schmitt

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0036

Aus dem Institut für Biologie,
Abteilung Pathologie
(Leiter: Prof. Dr. W. Gössner)
der Gesellschaft für Strahlen-
und Umweltforschung, Neuherberg

vorgelegt über das

Institut für Tierpathologie (Lehrstuhl für Allgemeine
Pathologie und Pathologische Anatomie) des Fachbereiches
Tiermedizin der Universität München

Lehrstuhl: Prof. Dr. Joachim von Sandersleben

HISTOMORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON ÖSTROGEN BEIM TRANSPLANTABLEN OSTEOSARKOM DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Franz Schmitt

aus

BURGLENGENFELD

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. J. von Sandersleben
Korreferent:	Prof. Dr. D. Stavrou
Tag der Promotion:	27. Juli 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINER LIEBEN FRAU

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 3

2. SCHRIFTTUM

2.1. ÖSTROGENE

2.1.1. Kurze Übersicht über Östrogene in Hinblick auf diese Arbeit 4

2.1.2. Wirkung von Östrogen auf die Zellkinetik des Knochens 5

2.1.3. Wirkung von Östrogen auf das Skelett und Wachstum bei Maus und Ratte 6

2.1.3.1. Einfluß des Alters 6

2.1.3.2. Einfluß der Dosis 6

2.1.4. Das morphologische Bild der Östrogen-induzierten Osteopetrose 7

2.1.5. Östrogenwirkung auf das lymphatische System 9

2.1.6. Östrogenwirkung auf das hämatopoetische System 10

2.1.7. Effekt von Östrogen auf Osteosarkomgenese und Osteosarkom 10

2.2. OSTEOSARKOME

2.2.1. Morphologie der primären Osteosarkome der Maus 11

2.2.2. Morphologie des transplantierten Osteosarkoms 12

2.2.3. Das transplantable Osteosarkom der Maus 13

2.2.4. Metastasen 15

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Versuchstiere 16

3.1.2. Tumormaterial 16

3.1.3. Transplantationstechnik 16

3.1.4. Östrogenbehandlung 17

3.1.5. Röntgenuntersuchung 17
3.1.6. Obduktion, Tumorentnahme und Tumorgrößenbestimmung 18
3.1.7. Histologische Technik 18
3.1.8. Bestimmung des Tumoranganges 19
3.1.9. Experimenteller Arbeitsplan 19
3.1.10. Ermittlung der Östrogendosis 20
3.1.11. Östrogenwirkung und Östrogennachweis 21
3.1.12. Statistische Auswertung 21

3.2. ERGEBNISSE
3.2.1. Angangsrate des Osteosarkoms 22
3.2.2. Bestimmung des Tumorvolumens und Abschätzung des Wachstumstempo 22
3.2.3. Metastasenbildung 23
3.2.3.1. Östrogenbehandlung 23
3.2.3.2. Geschlecht 23
3.2.3.3. Tumorvolumen und -alter 24
3.2.4. Histologische Untersuchungen 24
3.2.4.1. Morphologie des Osteosarkoms 24
3.2.4.2. Beurteilung der Knochenbildung des Osteosarkoms 26
3.2.5. Lymphatisches Gewebe 26
3.2.5.1. Lymphknoten 26
3.2.5.2. Thymus und Milzuntersuchung 27

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 28

5. ZUSAMMENFASSUNG 31

6. LITERATURVERZEICHNIS 51

1. EINLEITUNG

Nilsson und Rönnbäck (1973) konnten zeigen, daß bei Mäusen nach einer kombinierten Östrogen-Strontium-90 Behandlung häufiger Osteosarkome vom osteoklastischen Typ auftraten, als ohne Östrogen. Auch die Tumorinzidenz war unter Östrogeneinfluß erhöht. Anderseits ist bekannt, daß Östrogene am normalen Mausskelett eine Osteopetrose induzieren (Urist et al., 1950; Walker, 1973).

Ausgehend von diesen Befunden sollte am Modell des transplantablen Osteosarkoms der Maus geprüft werden, ob die Gabe von Östrogen einen direkten Einfluß auf die morphologische Differenzierung eines wachsenden Osteosarkoms hat. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwieweit die Ossifikation, die Angangsrate und das Wachstumstempo des Osteosarkoms durch Östrogenbehandlung verändert werden.

2. SCHRIFTTUM

2.1. ÖSTROGENE

2.1.1. Kurze Übersicht über Östrogene in Hinblick auf diese Arbeit

Östrogene gehören zur Gruppe der Steroidverbindungen, die auch als körpereigene Hormone vorkommen und als endogene Steroide bezeichnet werden. Das in dieser Arbeit verwendete 17ß-Östradiol - ein hochmolekularer Polyester des 17ß-Östradiols und der Phosphorsäure - ist das stärkste und biologisch wichtigste der natürlichen Östrogene.

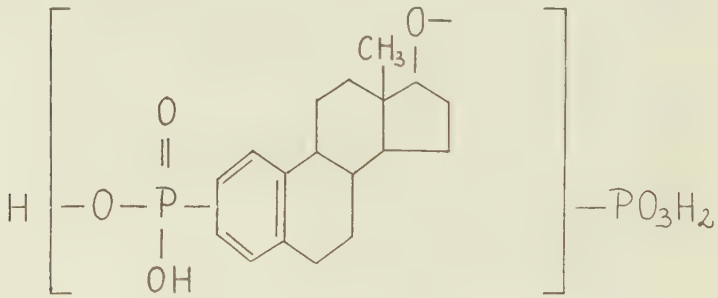

Abb. 1 Strukturformel von Estradurin - ein Polyester des 17ß-Östradiols und der Phosphorsäure

Um die besondere Reaktion des Knochenbaus bei Nagern auf 17ß-Östradiol zu untersuchen, sind Maus und Ratte für Versuche am besten geeignet. Diese beiden Tiergruppen zeigen den deutlichsten Effekt nach einer Östrogenbehandlung, nämlich osteopetrotische Veränderungen am Skelett (Gardner und Pfeiffer, 1938; Marks und Walker, 1976; Silberberg und Silberberg, 1971).

2.1.2. Wirkung von Östrogen auf die Zellkinetik des Knochens

Das Hormon Östrogen hat einen spezifischen Effekt bei Maus und Ratte auf den Metabolismus und die Struktur des Knochens. Die Wirkung von Östrogen, Steigerung der endostealen Knochenneubildung, beruht bei der Maus auf einer Zunahme der Osteoblastenzahl. Diese wird hervorgerufen durch Stimulierung zur Teilung und Modulation von undifferenzierten Vorläuferzellen, den Präosteoblasten, und von einem kleineren Prozentsatz vorhandener Osteoblasten (Simmons, 1962). Bei der Ratte bewirkt Östrogen eine Hemmung der Knochenresorption durch Osteoklasten (Budy et al., 1952; Shai und Wallach, 1973).

Der Effekt von Östrogen am osteogenen Gewebe der Maus ist mit Hilfe von markiertem Thymidin bereits 6 bis 12 Stunden nach Verabreichung von 1 mg Estradiol-Valerat an der Erhöhung des Markierungsindexes zu erkennen. Nach 24 Stunden ist die Markierung der Osteoblasten doppelt so hoch wie bei den Kontrollen (Simmons, 1962). Östrogene besitzen also die Fähigkeit,die endosteale Knochenbildung bis zum Verschluß der Knochenmarkshöhle zu stimulieren (Gardner und Pfeiffer, 1938; Urist et al., 1950).

Die Stimulierung zur erhöhten Osteoblastenbildung verändert aber nicht den natürlichen Werdegang der einzelnen Zellen und nicht die funktionelle Kapazität der einzelnen Osteoblasten (Simmons, 1966). Nur die größere Anzahl der Osteoblasten bewirkt die endosteale Knochenneubildung und führt dann zu einer Osteopetrose. Der genaue Mechanismus, der diesen Effekt bewirkt, ist unbekannt. Bis jetzt konnten noch keine Östrogen-bindenden Proteine, sogenannte "Rezeptoren", in den Knochenzellen gefunden werden (Caputo et al., 1976; Nutik und Cruess, 1974; van Paassen et al., 1978).

Die durch Östrogen stimulierten Präosteoblasten und Osteoblasten können sich zu Osteozyten differenzieren, außerdem aber auch durch Fusion Osteoklasten bilden (Corwin und Morehead, 1971; Rohr, 1964; Simmons, 1962). Corwin und Morehead (1971) fanden speziell in der Beckensymphyse von Mäusen bei Östrogenbehandlung (0,005 mg Östradiol 17ß-Cyclopentyl-Propionate) mit Hilfe von H^3-Thymidin eine Zunahme der Osteoklasten und gleichzeitig nach einem kurzen Anstieg eine ständige Abnahme der Osteoblastenzahl.

2.1.3. Die Wirkung von Östrogen auf das Skelett und Wachstum bei Maus und Ratte

In der Arbeit von Silberberg und Silberberg (1971) ist eine gute Übersicht über die Wirkungsweise von Östrogenen auf das Skelett verschiedener Tiergruppen zu finden. Der zu beobachtende Effekt von Östrogen auf das Skelett und Wachstum hängt vom Alter der Versuchstiere, Dosis und Einwirkungszeit des Medikaments und der Östrogenart ab.

2.1.3.1. Einfluß des Alters

Bei ungeborenen, neugeborenen und Mäusen bis zu einem Alter von drei Wochen ließ sich in den ersten Tagen nach der Östrogenbehandlung makroskopisch und röntgenologisch keine Veränderung nachweisen. Die stärksten osteopetrotischen Veränderungen am Skelett zeigten sich nach Gabe von Östrogen bei 1 bis 6 Monate alten Mäusen im Röntgenbild und bei der histologischen Untersuchung. Mit zunehmendem Alter (ab 1 Jahr) nimmt die Wirkung von Östrogen auf das Skelett ab (Silberberg und Silberberg, 1941; Urist et al., 1950; Walker, 1973).

2.1.3.2. Einfluß der Dosis

Den Einfluß der Einwirkungszeit von Östrogen und die Wirkung verschiedener Östrogenarten bei Mäusen beschreibt Urist et al. (1950). Östrogen in niedriger Dosierung, vor

allem in Verbindung mit Androgenen, wie Testosteron, kann eine anabole Wirkung hervorrufen (McLean und Urist, 1968). Suzuki (1959) konnte am Mäusefemur eine Stimulierung des Wachstums und der Resorption des Knochens feststellen.

Dagegen bedingt Östrogen in hoher Dosierung folgende Veränderungen:

1. Eine dem Alter der Tiere proportionale Wachstumshemmung, die außerdem direkt proportional der Dosis und Einwirkungszeit des Östrogens ist (Budy et al., 1952; McLean und Urist, 1968; Shai und Wallach, 1973).

2. Eine signifikante Reduzierung der Gewichtszunahme bei wachsenden Tieren (Money et al., 1952; Sakai et al., 1970; Shai und Wallach, 1973).

3. Eine Beschleunigung der Skelettreifung (Howard, 1966), z.B. durch vorzeitigen Verschluß der Epiphysenfugen (Gardner und Pfeiffer, 1938; Urist et al., 1950).

4. Eine Hemmung des Längenwachstums der Röhrenknochen bei Maus und Ratte (Urist et al., 1950; Budy et al., 1952). Bei der Ratte kann das Ausmaß der Hemmung bis zu 30% betragen (Lindquist et al., 1960).

5. Eine Demineralisierung der Beckenknochen und Beckensymphyse im Gegensatz zu den Röhrenknochen (Gardner, 1936; Haines, 1957). An der Beckensymphyse außerdem eine Relaxierung und Erweiterung mit einem teilweise Ersetzen des Symphysenknorpels durch Bindegewebe (Burrows, 1935; Urist et al., 1950).

2.1.4. Das morphologische Bild der Östrogen-induzierten Osteopetrose

Eine ständige Behandlung mit hoher Östrogendosis führt zu einer morphologischen Veränderung des Röhrenknochens, die sich durch die stetige Akkumulierung der endostealen und trabekulären Knochenneubildung bis zum eventuellen Verschluß der Knochenmarkshöhle als eine Osteopetrose

bei Maus und Ratte darstellt (Gardner und Pfeiffer, 1938; Urist et al., 1950; Budy et al., 1952; Walker, 1973).

Haines (1957) untersuchte Femur und Tibia von 6 bis 9 Wochen alten kastrierten Mäusen, die mit 1,5 mg Estradiolbenzoat täglich über einen Zeitraum von 30 Tagen behandelt wurden. Die beiden Knochen zeigten in der Epi- und Metaphyse eine Zunahme und Verdickung der Trabekel, die dann langsam in die Knochenmarkshöhle wuchsen. Am 16. Tag nach der Östrogenbehandlung war die Knochenmarkshöhle mit einem Netz von Knochentrabekel angefüllt und das Knochenmark fast vollständig verdrängt.

Eine beginnende Osteopetrose in den Röhrenknochen zeigt sich zuerst im distalen Femur und in der proximalen Tibia (Haines, 1957; Urist et al., 1950). Diese Tatsache benutzte Urist et al. (1950) zum Messen der osteogenetischen Reaktion des Skeletts auf die Östrogenbehandlung mit Hilfe der Histologie und des Röntgenbildes. Die ganze Reaktion von der ersten Veränderung bis zum vollständigen Verschluß der Markhöhle des Femurs wurde in vier Stufen eingeteilt:

1. Gesteigerte Verdichtung der normalen oder leicht verlängerten Metaphyse
2. Zweifache Verlängerung der distalen Metaphyse
3. Zuwachsen der Markhöhle mit endostealem Knochen von beiden Metaphysen aus bis auf einen zentralen Teil der Knochenmarkshöhle
4. Vollständiger Verschluß der Markhöhle

Histologisch kann in allen vier Stufen, im Röntgenbild erst ab der zweiten Stufe die Wirkung von Östrogen auf den Femur erkannt werden.

Als Folge der endostealen und trabekulären Knochenneubildung tritt eine verstärkte Mineralisation auf, die dann zu einer Zunahme des Skelettgewichtes im Vergleich zum Körpergewicht der behandelten Tiere führt (Shai und

Wallach, 1973). Der Ca-Prozentsatz in den Röhrenknochen der Maus nimmt um das Doppelte zu, während er in den anderen Teilen nur um 25% steigt (Clavert et al., 1945). Auch der totale Lipidgehalt und die Triglyceride nehmen in den Röhrenknochen unter Östrogeneinfluß signifikant zu (Sakai et al., 1970).

2.1.5. Östrogenwirkung auf das lymphatische System

Östrogene und andere Steroide bewirken am lymphatischen Gewebe, besonders am Thymus, eine deutliche Veränderung. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind nur bei den Thymusuntersuchungen einheitlich. Bei der Wirkung des Östrogens auf das periphere lymphatische Gewebe und auf die zelluläre Immunität widersprechen sich die beschriebenen Beobachtungen (Dougherty, 1952).

Eine akute Thymusinvolution nach Gabe von Östrogen oder anderen Steroiden wurde von Dougherty (1952), Kappas und Palmer (1963) und Money et al. (1952) beschrieben. Diese Involution bei einer Östrogendosis von 0,5 mg Estradiol, dreimal wöchentlich zwei Wochen lang, beschreiben Thompson et al. (1965) als eine sehr deutliche Abnahme der Rindendicke und einen reduzierten Zellgehalt des Thymusmarkes. Die Folge davon ist eine Beeinträchtigung der immunologischen Kapazität der Thymuszellen (Thompson et al., 1966). Die Behandlung von Mäusen mit Steroidmetaboliten verursacht immunsuppressive Wirkungen (Kotani et al., 1974; Rembiesa et al., 1974). Außerdem konnte eine Herabsetzung der immunologischen Reaktivität, eine Verminderung und teilweise Zerstörung der Lymphozyten (Chiodi, 1938) und eine Reduktion des lymphatischen Gewebes mit nachfolgender Nekrose bei entsprechend langer Behandlung (nach 20 Wochen mit 1,0 mg Diethylstilbestrol/Woche über eine Gesamtzeit von 25 Wochen) nachgewiesen werden (Urist et al., 1950). Diese Ergebnisse werden von Dougherty (1952) und Kappas

et al. (1963) bestätigt. Sie fanden, daß Östrogen eine Gewichtsabnahme von Thymus und Lymphknoten bewirkt, aber keinen Effekt auf die zellulären Bestandteile des Blutes und die zirkulierenden Antikörper zeigt (Jacobson, 1944; Kappas et al., 1963).

Andere Forschungsgruppen wie Money et al. (1952) und Thompson et al. (1965) beobachteten dagegen nur eine geringe oder gar keine Lymphknotenatrophie ohne mikroskopische Veränderungen bei Estriol- oder Estradiolgabe von 0,5 mg, dreimal wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen.

2.1.6. Östrogenwirkung auf das hämatopoetische System

Unterschiedliche Ergebnisse werden auch über die Östrogenwirkung auf das hämatopoetische System in der Literatur beschrieben. Jacobson (1944) und Thompson et al. (1965 und 1966) untersuchten angesichts der Osteopetrose in den Röhrenknochen die Wirkung von Östrogen auf dieses System und fanden keine histologischen Veränderungen im Knochenmark, in der Milz und Leber. Eine Zunahme der extramedullären Hämatopoese konnte von Jacobson (1944) und Thompson et al. (1966) nachgewiesen werden. Silberberg und Silberberg (1971) erklären es mit dem Zuwachsen der Markhöhle und der damit verbundenen Abnahme der Funktionsfähigkeit des Knochenmarks. Die Blutbildung wird dann hauptsächlich durch eine Kompensation in der Milz bestritten (Marks und Walker, 1976).

Urist et al. (1950) fanden hingegen, daß nach 25 Wochen eine Zerstörung des hämatopoetischen Gewebes proportional zur Dosis und Einwirkungszeit von Östrogen zu erkennen war.

2.1.7. Effekt von Östrogen auf Osteosarkomgenese und Osteosarkom

Miller et al. (1943) stellten bei Östrogengabe eine

erhöhte Inzidenz und schnellere Entwicklung von Osteosarkomen bei Mäusestämmen mit spontanen Knochentumoren fest. Bei einer kombinierten Östrogen-Strontium-90 Behandlung fanden Nilsson und Rönnbäck (1973) eine erhöhte Osteosarkominzidenz im Vergleich zur Strontium-90 Behandlung.

Nach Gabe von 17ß-Estradiol (1,3119 pgm/ml) beobachteten Scranton et al. (1975) mit Hilfe von markiertem Thymidin eine Reduzierung der DNS-Synthese in 6 Osteosarkomzellinien des Menschen und regten durch diese Ergebnisse eine Behandlung von Osteosarkomen mit Östrogen an.

Bei der Interpretation ihrer Resultate gehen Nilsson (1970) und Nilsson und Rönnbäck (1973) von der Vorstellung der Mehrstufenonkogenese aus, d.h. daß die eigentliche Tumorentwicklung einen zusätzlichen Stimulus zur Zellproliferation voraussetzt. Östrogenbehandlung regt die Zellen des osteogenen Gewebes zu vermehrter Proliferation an (Simmons, 1962). Östrogen kann also u.a. als ein Promotor der Osteosarkomgenese angesehen werden.

2.2. OSTEOSARKOME

2.2.1. Morphologie der primären Osteosarkome der Maus

Die kurzlebigen α-Strahler Radium-224 und Thorium-227 induzieren Osteosarkome. Die Dosisbeziehung der Osteosarkomhäufigkeit ist bei Müller et al. (1978) beschrieben. Gössner et al. (1972) fanden nach Gabe von Ra-224 im Dosisbereich zwischen 5 und 100µCi/kg nach einer mittleren Latenzzeit von 18 Monaten in ca. 10% der Fälle Osteosarkome. Die Autoren beschreiben Morphologie und Histochemie der strahleninduzierten Osteosarkome. Das histologische Bild dieser Osteosarkome ist vielgestaltig, vorwiegend finden sich osteoblastische, aber auch fibroblastische und anaplastische Areale. Nach dem Zell-

bild kann die Morphologie der osteoblastischen Sarkome in zwei Differenzierungsgrade eingeteilt werden:

1. Die Tumorzellen weisen auch bei Knochenbildung keine osteoblastenähnliche Differenzierung auf.

2. Die Tumorzellen zeigen die charakteristischen strukturellen Merkmale des Osteoblasten.

Histochemisch läßt sich in den meisten Tumorzellen alkalische Phosphatase nachweisen. Saure Phosphatase findet sich nicht nur in den mehrkernigen, osteoklastenähnlichen Riesenzellen, sondern z.T. auch in einkernigen Zellen sehr intensiv.

Ein ähnlich morphologisches Bild, wie unter Differenzierungsgrad 2 beschrieben, fanden Barrett et al. (1944) bei einem spontanen Osteosarkom einer C3H-Maus und dem Transplantationstumor bis zur 5. Generation.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von strahleninduzierten Osteosarkomen bei NMRI-Mäusen konnten Marquart et al. (1974) einen hohen zellulären Differenzierungsgrad des Tumors feststellen. Die häufigste Zellart waren osteoblastenähnliche Zellen von polymorpher Gestalt mit atypischen Zellkernen. Zellen mit Merkmalen von Osteoklasten ließen sich in den untersuchten Tumoren nur vereinzelt beobachten. Die Mineralisation des Osteoids in den Osteosarkomen war häufig präossal, d.h. in Form verschieden dicht liegender solitärer Apatitkristallbüschel. Neben trabekulären Knochen befand sich in manchen Gewebsproben eine zu Schollen unterschiedlicher Größe geformte, mineralisierte Knochensubstanz. In Tumorabschnitten mit wenig mineralisierter Knochensubstanz kamen manchmal abnorme Kollagenfibrillen vor.

2.2.2. Morphologie des transplantierten Osteosarkoms

Shimokawa (1974) beobachtete an dem transplantablen Gardner-Osteosarkom 519 (gefunden von W.U. Gardner,

Department of Anatomy, Yale School of Medicine, 1955) zwischen der 80. und 95. Generation, daß der Tumor nicht aus einem Zelltyp, sondern aus Arealen mit verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt ist, die sich mit dem Wachstum des Tumors ändern. Er klassifizierte das Gardner-Osteosarkom 519 in vier histologisch unterscheidbare Typen:

1. Spindelzelltyp, zu Beginn des Wachstums mit zahlreichen Mitosen in den Tumorzellen
2. Riesenzelltyp, im wachsenden Tumor mit verringerter Mitoseaktivität im Vergleich zum Spindelzelltyp
3. Retikulärer Zelltyp, im wachsenden Tumor mit geringer Mitosetätigkeit in den Sarkomzellen und wenige Riesenzellen
4. Osteoid-Knochenzelltyp, im wachsenden Tumor mit reduzierter Tumorzellzahl und sehr selten Mitosen und Riesenzellen

2.2.3. Das transplantable Osteosarkom der Maus

Bei der Implantation eines Tumors überlebt nur ein geringer Prozentsatz der Transplantatzellen im Empfänger und dient dann dem neuwachsenden Tumor als Grundstock (Klein, 1965). Das Anwachsen des Transplantats ist abhängig von der Widerstandskraft der transplantierten Tumorzellen und von der individuellen Abwehrkraft oder Toleranz des Empfängertieres (Klein, 1965; Nagel und Geiger, 1971).

In der Literatur wird allgemein die subkutane Transplantation bevorzugt. Stewart et al. (1959) geben an, daß nach einer intramuskulären, intraperitonealen und intrathorakalen Transplantation eines Osteosarkoms eine bessere Ossifikation erfolgt als nach einer subkutanen. Strubel (1979) konnte an dem im Labor vorhandenen transplantablen TV-Osteosarkom der NMRI-Maus feststellen, daß es als Homogenat gespritzt kaum

Knochenbildung zeigte. Im Gegensatz dazu führte die Transplantation kleiner, mit Knochenstücken ausgestatteter Tumorstückchen vom gleichen Osteosarkom zu Tumoren mit starker Knochenbildung. Außerdem konnte Strubel (1979) beobachten, daß intramuskulär transplantierte Tumoren weniger zur Nekrose neigten als subkutan transplantierte. Die subkutane Übertragungsart wies dafür eine höhere Tumorangangsrate auf. Der Tumorangang lag bei männlichen NMRI-Mäusen (Alter 1 bis 8 Monate) höher als bei weiblichen (s. auch Shimokawa, 1974).

Für Untersuchungen an transplantablen Osteosarkomen ist außerdem die Beständigkeit des morphologischen Bildes und die Erhaltung der Fähigkeit zur Knochenbildung in einer Transplantatlinie bedeutsam. Strubel (1979) konnte bei dem schon erwähnten Osteosarkom nach 70 Generationen keine Verminderung der Fähigkeit zur Knochenbildung feststellen. Heiple et al. (1968) berichten von einem Osteosarkom der C3H-Maus (gefunden von Th. Dunn, National Cancer Institut), das noch in der 100. Generation seine zelluläre Differenzierung und die Fähigkeit zur Knochenbildung beibehalten hat. Nach 200 Transplantationsgenerationen beobachteten Friedman und Finsterbush (1972) nach intramuskulärer Übertragung einer Zellsuspension ($2x10^4$ bis $5x10^6$ Zellen) eine Beibehaltung der Knochenbildung. Bei der subkutanen Transplantation (Tumorstücke von 2 mm^3 Größe) zeigte sich auch keine morphologische Veränderung. Auch Shimokawa (1974) konnte nach 95 Generationen des Gardner-Osteosarkoms 519 die Knochenbildung nachweisen. Ähnliche Ergebnisse beschreiben van Putten (1968) bei dem transplantablen Osteosarkom C22LR; Kalenak und Rogers (1972) bei dem C3H-Osteosarkom, das 1955 spontan entstanden ist, und Amitani et al. (1974) bei dem BF- und Gardner-Osteosarkom.

Es ist andererseits bekannt, daß spontane und induzierte Osteosarkome nach mehreren Transplantationsgenerationen auch ihre Fähigkeit zur Knochenbildung verlieren können und daß ihr histologischer Differenzierungsgrad abnimmt (Barrett et al., 1944; Hilberg, 1956; Murphy, 1966; Stewart, 1959).

2.2.4. Metastasen

Mit Hilfe von Röntgenbild und Ganzkörperautoradiographie nach Injektion von Strontium-90 konnten Nilsson und Ullberg (1962) 8 Wochen nach Transplantation eines Osteosarkoms der CBA-Maus bei allen Tieren Metastasen nachweisen. Metastasen kamen am zahlreichsten in der Leber, gefolgt von der Lunge, dem Abdomen und Skelett vor. Strubel (1979) beobachtete am transplantablen TV-Osteosarkom der NMRI-Maus sowohl nach intramuskulärer wie nach subkutaner Transplantation 4 Wochen nach Transplantation häufig in der Leber, vereinzelt in der Lunge und selten in der Milz Metastasen. Ab dem 45. Tag fanden Kalenak und Rogers (1972) bei allen Mäusen, denen subkutan ein Osteosarkom implantiert worden war, sichtbare Metastasen. Andere transplantable Osteosarkomlinien findet man in Tabelle 1. Boeryd und Suurküla (1973) stellten fest, daß weder Thymektomie noch immunsuppressive Behandlung Einfluß auf die Metastasierung eines transplantierten Sarkoms haben, das von einem mit MCA induzierten Sarkom abstammt. Andererseits wurde bei der Behandlung mit Steroidhormonen, wie Cortison, eine Zunahme der Metastasenbildung beobachtet (Fidler, 1975).

Van Putten et al. (1975) erzeugten durch intravenöse Injektion einer Zellsuspension des Osteosarkoms C22LR Lungenmetastasen. Starke Immunsuppression oder Immunisation verursachten keine signifikante Änderung in der Zahl der Metastasen. Die Anzahl der Metastasen erhöhte sich aber um den Faktor 100 nach Gabe von Zytostatika und Corynebacterium parvum.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 71 bis 170 Tage alte NMRI-Mäuse beider Geschlechter aus institutseigener SPF-Zucht benutzt. Das Alter lag damit in dem Bereich von 1 bis 6 Monaten, den Urist et al. (1950) als den optimalen für die Östrogenwirkung auf das Skelett beobachtet hatte. Diese Mäuse wurden unter gleichen Bedingungen in einem vollklimatisierten Stall in Makrolonkäfigen gehalten. In jedem Käfig waren entweder 5 weibliche oder 3 männliche Tiere. Das Futter wurde ad libitum angeboten: Standarddiät der Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe; die Tränke bestand aus in Tropfflaschen abgefülltem Leitungswasser.

3.1.2. Tumormaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Transplantatlinie eines osteoblastischen Osteosarkoms der NMRI-Maus verwendet. Der ursprüngliche Tumor wurde in einer Gruppe von weiblichen NMRI-Mäusen am 3.5.1973 beobachtet, denen im Alter von 4 Wochen 25µCi/kg Ra-224 intraperitoneal injiziert worden war. 24 Monate nach der Injektion wurde der primäre Tumor am linken Os ilium gefunden (Gössner et al., 1976). Zum Zeitpunkt der durchgeführten Versuche war der Tumor in der 28. Generation (Strubel, 1979).

3.1.3. Transplantationstechnik

Das Tumormaterial für die Weitertransplantation wurde unter sterilen Bedingungen von einer mit Chloroform getöteten Spendermaus (Tabelle 6) gewonnen, geteilt

und die eine Hälfte in einer Petrischale mit steriler, gekühlter, physiologischer Kochsalzlösung mit einem Skalpell in Stücke von ca. 1 mm^3 zerkleinert. Mit Hilfe einer Injektionsnadel (Nr. 4) und eines Mandrin wurden drei kleine Osteosarkomstücke in den rechten Oberschenkel einer Maus intramuskulär transplantiert. Die andere Hälfte des Tumors wurde für die spätere histologische Untersuchung in Formalin fixiert.

3.1.4. Östrogenbehandlung

Vor und nach der Transplantation des Osteosarkoms wurden die Mäuse mit dem Langzeitpräparat "ESTRADURIN" (Leo-Bastian Werke GmbH, München), ein hochmolekularer Polyester des 17ß-Östradiols und der Phosphorsäure, behandelt. Nach Nilsson und Rönnbäck (1973) wurden 1,5 mg des Medikaments ESTRADURIN in Dosen zu 3xO,5 mg oder 1x1 mg und 1xO,5 mg subkutan in die Rückengegend der Maus verabreicht.

3.1.5. Röntgenuntersuchung

Vor jeder Obduktion wurden die Versuchstiere geröntgt (Faxitron, Kodirex Film). Die Röntgenbilder wurden zu folgenden Charakterisierungen benötigt:

1. Tumorangang im rechten Oberschenkel der Maus
2. Wirkung der unterschiedlichen Östrogendosen am Skelett (Osteopetrose der Röhrenknochen)
3. Bestimmung des Ossifikationsgrades der einzelnen Tumoren und ihre Einteilung in vier Grade:

O	=	keine Ossifikation	Abb. 2A
1	=	geringe Ossifikation	Abb. 2B
2	=	mittlere Ossifikation	Abb. 2C
3	=	starke Ossifikation	Abb. 2D

3.1.6. Obduktion, Tumorentnahme und Tumorgrößenbestimmung

Die Versuchstiere wurden nach der im Versuchsplan (Tabelle 2) festgesetzten Zeit mit Chloroform getötet, seziert und makroskopisch untersucht.

Die Breite und Länge des Tumors wurde mit einer Schublehre gemessen. Aus diesen zwei Meßergebnissen wurde unter Annahme, daß der Tumor einer Ellipse entspricht, die Tumorgröße errechnet (Attia und Weiss, 1966) und für die statistische Auswertung dem Tumorvolumen >0 oder > 1 zugeordnet.

Das Eventerat, die Leisten- und Halslymphknoten und das rechte Hinterbein mit oder ohne Tumor wurden dann entfernt und in Formalin gelegt zur späteren histologischen Untersuchung.

3.1.7. Histologische Technik

Nach der Sektion wurden Eventerat, Leisten- und Halslymphknoten und rechtes Bein der Versuchstiere eine Woche in 4% Formalin fixiert; das rechte Hinterbein wurde danach 4 Wochen in EDTA entkalkt. Das rechte Hinterbein wurde zum Vergleich von Tumor- und normalem Knochengewebe so geschnitten, daß Teile von Femur und Tibia mit dem Tumor auf dem Schnitt zusammentrafen. In Paraffin eingebettet wurden die Teile geschnitten und nach folgenden Methoden angefärbt:

1. Hämalaun-Eosin (HE): für Tumor, Lymphknoten, Milz und Thymus
2. Silberimprägnation nach Lendrum: für Tumor, d.h. für die Einteilung des Osteoids im Lichtmikroskop in feinnetzige, kompakte und grobtrabekuläre Tumorknochenstrukturen
3. Saure Phosphatase Nachweis zur Darstellung von Osteoklasten:

Von vier männlichen Mäusen, davon drei mit Östrogen behandelt und ein Kontrolltier, wurden die Tumorscheiben 24 Stunden in kaltem Ca-Formalin fixiert und sieben Tage in kaltem EDTA (Mori et al., 1965) entkalkt, danach mit dem Gefriermikrotom geschnitten und gefärbt. Der Nachweis der sauren Phosphatase erfolgte nach Barka und Anderson (1963) mit Naphthol-AS-TR-Phosphat und Hexazonium-Pararosanilin.

4. In den Versuchen 1 und 2 wurde außerdem die van Gieson-Färbung und die Perjodsäure-Schiff-Reaktion bei den Tumoren durchgeführt.

3.1.8. Bestimmung des Tumoranganges

Mit Hilfe des Obduktionsprotokolls, Röntgenbildes und der histologischen Untersuchung wurde der Angang eines jeden Tumors bei den weiblichen und männlichen Mäusen festgestellt. Ab einem Tumordurchmesser von 3 mm wurde ein Tumor als Angang gewertet.

3.1.9. Experimenteller Arbeitsplan

Die Erzeugung der Tumoren für alle Untersuchungen dieser Arbeit (Ergebnisse 3.2.) wurde in Anlehnung an das Schema von Nilsson und Rönnbäck (1973) nach dem Arbeitsplan (s. Tabelle 2) durchgeführt. Die Reihenfolge entspricht dem zeitlichen Ablauf dieser Arbeit.

Der in Tabelle 2 aufgestellte Arbeitsplan unterteilte sich noch in weitere Untersuchungen:

Teil I: Vier Gruppen von jeweils 5 weiblichen und 5 männlichen NMRI-Mäusen wurden für diese Experimente benötigt. Den Versuchstieren wurden die Tumoren TV 104/428 (Versuch 1), TV 107/433 (Versuch 2), beide Transplantate stammen aus der 28. Tumorgeneration, und die Tumoren TV 113/438 (Versuch 3) und TV 115/439

(Versuch 4), die aus der 29. Generation stammen, intramuskulär transplantiert. Die anschließende Behandlung mit dem Östrogen Estradurin erfolgte in allen vier Versuchen nach Versuchsschema (Tabelle 3).

Im Versuch 2, im Teil I wurden noch zusätzlich 10 männliche und 10 weibliche NMRI-Mäuse gleichen Alters ohne Tumor nur mit Östrogen behandelt, um die Auswirkung von Estradurin auf das Skelett und Gewebe zu untersuchen.

Teil II: In den Versuchen 5 und 6 sollte die Östrogenwirkung von Estradurin über eine längere Zeit am wachsenden Tumor beobachtet werden. Die Estradurinbehandlung erfolgte wie im Versuchsschema 2 (Tabelle 4) beschrieben.

Teil III: Für diese Untersuchungen wurden nur 60 männliche NMRI-Mäuse benutzt (Versuch 7 und 8). Sie wurden vor und nach der Tumortransplantation mit Estradurin behandelt (siehe Versuchsschema 2, Tabelle 4), um zu zeigen, ob Östrogene einen Einfluß auf den Tumorangang ausüben.

3.1.10. Ermittlung der Östrogendosis

Die mit Osteosarkomen, aus verschiedenen Generationen stammend, transplantierten NMRI-Mäuse aus den Versuchen 1 bis 4 (Teil I, Tabelle 3) erhielten mit Ausnahme der Kontrolltiere zwei unterschiedliche Estradurinmengen (1 mg oder 1,5 mg).

Bei den Mäusen aus den drei Östrogengruppen des 1. Versuches (Tabelle 3) zeigte sich im Röntgenbild bei allen im wesentlichen eine Osteopetrose im Femur. Nur in den Gruppen mit einer Gesamtdosis von 1,5 mg Estradurin fand sich eine etwas besser ausgebildete Osteopetrose. Diese Ergebnisse wurden in den drei nachfolgenden Versuchen bestätigt, die unter den gleichen Bedingungen, nur mit unterschiedlichen Tumorgenerationen durchgeführt worden waren.

Ab Versuch 5 (Tabelle 4) wurde die Gesamtdosis von 1,5 mg Estradurin, die den besseren Östrogeneffekt zeigte, beibehalten. Die Ergebnisse der 1. Tiergruppe aus den Versuchen 1 bis 4 zusammen mit den Gruppen 2 und 3 wurden weiterhin in allen Untersuchungen berücksichtigt. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt.

3.1.11. Östrogenwirkung und Östrogennachweis

Die Wirkung des Östrogens auf das Skelett war bei allen Behandlungsschemata im Röntgenbild gut, bei der lichtmikroskopischen Untersuchung des Schnittes dann sehr deutlich am Femur zu erkennen. Es konnte innerhalb der Epi- und Metaphyse des Femurs eine vermehrte Anzahl und eine Verdickung der Knochentrabekel im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen beobachtet werden. Von der Metaphyse aus wuchsen die Knochentrabekel in Richtung Markhöhle, die 28 Tage nach der Östrogenbehandlung teilweise mit einem Netz von Trabekeln angefüllt war. Die Veränderungen am Skelett führten zu einer Osteopetrose in den Röhrenknochen der Maus.

3.1.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse von Angangsrate, Tumorvolumen und Ossifikation erfolgte mit Hilfe des χ^2-Testes bzw. des exakten Testes nach Fisher.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Angangsrate des Osteosarkoms

Das Alter der Mäuse bei der Transplantation spielt keine große Rolle beim Angang eines transplantablen Osteosarkoms, solange die Mäuse nicht jünger als einen Monat und älter als sechs Monate sind (Strubel, 1979; Urist et al., 1950).

In Abb. 5 ist die Angangsrate für die mit Östrogen behandelten männlichen Mäuse (85%) und Kontrollmäuse (82%) mit unterschiedlicher Versuchsdauer dargestellt. Für die weiblichen mit Östrogen-behandelten Mäuse beträgt die Angangsrate 72% und für die Kontrollen 73%. Aus den Tabellen 9 und 10 und der Abb. 5 geht hervor, daß kein großer Unterschied in der Angangsrate des Tumors nach der Gabe von Estradurin zu verschiedenen Zeitpunkten (Tabelle 2) und zwischen männlichen und weiblichen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten war.

Als Vergleich zu den eigenen Untersuchungen wurden noch die Ergebnisse aus der laufenden Transplantationslinie von 8 bis 16 Wochen alten NMRI-Mäusen während den Generationen 5 bis 19 herangezogen. Das Tumoralter lag zwischen 14 und 42 Tagen und die Anzahl der Mäuse betrug 282 männliche und 385 weibliche. Auch hier war kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren beweisbar. Die Angangsrate lag bei den männlichen Mäusen bei 68% (194 Mäuse) und bei weiblichen Mäusen bei 62% (239 Mäuse).

3.2.2. Bestimmung des Tumorvolumens und Abschätzung des Wachstumstempo

Das Tumoralter und -volumen des Osteosarkoms ließen die ungefähre Abschätzung des Wachstumstempo eines Tumors zu (Abb. 6). Alle Versuchsbedingungen und Er-

gebnisse werden in den Tabellen 7 und 8 dargestellt, und die bestimmten Tumorvolumen in zwei Größenklassen eingeteilt.

Außerdem wurde für jedes Tumoralter die Anzahl der Tumorgrößen (>0 und >1) aus den Tabellen 7 und 8 abgelesen und daraus die "relative Häufigkeit (%)" des Tumorvolumens (>0 und >1) nach Östrogenbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen bestimmt. Diese Ergebnisse, zusammengefaßt in Tabelle 5 und die statistische Auswertung zeigen, daß zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im Tumorvolumen zwischen Östrogenbehandelten und Kontrolltieren zu erkennen ist. Damit darf angenommen werden, daß das Wachstumstempo in beiden Gruppen etwa gleich ist.

3.2.3. Metastasenbildung

In Tabelle 9 und 10 sind die bei der Obduktion makroskopisch gefundenen Metastasen aufgezählt. Sie wurden alle histologisch untersucht. Bei einer Gesamtzahl von 242 männlichen und weiblichen Versuchstieren mit Tumor wurde in 36 (14%) Mäusen 35mal Leber- (83%), 5mal Lungen- (11%) und 2mal Milzmetastasen (4%) beobachtet (Aufgliederung in Tabelle 11 und Abb. 10).

3.2.3.1. Östrogenbehandlung

Bei den männlichen Tieren werden nach Östrogengabe häufiger Metastasen beobachtet, als bei den Kontrollen (Abb. 10). Dieser Unterschied ist aber statistisch nicht zu sichern.

3.2.3.2. Geschlecht

Faßt man männliche und weibliche Tiere jeweils zusammen (was erlaubt erscheint, da der Anteil der Östrogenbehandlung und die Alterszusammensetzung etwa gleich ist) so zeigten 152 männliche Tiere 31 Metastasen (20%) und 90 weibliche Tiere 5 Metastasen (5%). Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0{,}01$).

Bei 28 Tagen Transplantatalter ist der Unterschied besonders deutlich ($p < 0,01$). Bei den 63 weiblichen Mäusen war bei dieser Versuchsdauer noch keine Metastase zu beobachten, während bei 68 männlichen bereits 18 Metastasen zu sehen waren.

Der Geschlechtsunterschied besteht auch bei den im Labor vorhandenen NMRI-Mäusen, die mit dem Osteosarkom transplantiert worden waren. Es zeigten sich bei 193 männlichen Mäusen 31 Metastasen (16%) im Vergleich zu 19 Metastasen (10%) bei 189 weiblichen Mäusen. Hier ist der Unterschied nicht signifikant.

3.2.3.3. Tumorvolumen und -alter

Bis auf einen Fall sind sämtliche Tiere mit Metastasen erst bei einem Tumorvolumen > 1 cm^3 beobachtet worden (Abb. 9). Bei einer Versuchsdauer von 14 Tagen wurden noch keine Metastasen gesehen. Nach 28 Tagen wurden bei 131 männlichen und weiblichen untersuchten Mäusen 18 Metastasen (13%) gefunden. Bei 58 männlichen und weiblichen Mäusen konnten nach 42 Tagen Tumorwachstum 22 Metastasen (37%) festgestellt werden. Der Unterschied zwischen der Anzahl der Tumoren mit Metastasen bei einer Versuchsdauer von 28 und 42 Tagen ist signifikant ($p < 0.05$).

3.2.4. Histologische Untersuchungen

3.2.4.1. Morphologie des Osteosarkoms

Die geschnittenen und mit HE angefärbten Osteosarkome der Tiere aus den Versuchen 1 bis 8 (Tabelle 2) zeigten folgendes histologisches Aussehen:

1. Tumorabschnitte, in denen das Bild des zellreichen, polymorphzelligen Sarkoms mit unregelmäßig verteilten Knochenpartikeln und teilweiser Faserbildung und spindeligen Zellen zu sehen war (Abb. 3A).

2. Zellulär differenzierte Tumorteile, in welchen große osteoblastenähnliche Zellen beobachtet werden

können. Zwischen diesen "Osteoblasten" lassen sich Knochentrabekel erkennen; teilweise zeigt sich auch das Bild des spongiösen Knochens (Abb. 3B und C).

Ab einem Tumoralter von 28 Tagen wurden bei vielen Versuchstieren im Zentrum des Osteosarkoms entweder ein zusammenhängendes nekrotisches Gebiet von unregelmäßiger Gestalt oder mehrere, kleine Nekroseherde beobachtet. Diese Nekroseherde traten in unregelmäßiger Anordnung auf.

In allen Tumorabschnitten sowohl bei den behandelten wie bei Kontrolltieren waren nur sehr wenige Osteoklasten erkennbar.

Die Infiltration der Muskulatur war z.T. gut zu erkennen (Abb. 4). In den übrigen Fällen zeichneten sich die Tumoren schon durch ihre Atypie, Zellpolymorphie und zahlreichen Mitosen als bösartige Geschwulst aus.

Im Tumor wie auch im Knochen ist die saure Phosphatase vorwiegend in Osteoklasten, die einen Indikator für den Knochenabbau darstellen, zu beobachten. Beim Nachweis der sauren Phosphatase in den untersuchten Schnitten wurden sowohl bei den mit Östrogen-behandelten Tieren wie bei den Kontrollen nur wenige osteoklastenähnliche Zellen gefunden. Diese Beobachtung bestätigt das Ergebnis der histologischen Untersuchung, daß die hier untersuchten Tumoren nur wenige Osteoklasten bilden.

Weder nach Östrogenbehandlung noch bei den Kontrolltieren konnte eine entzündliche Umgebungsreaktion (lymph-, plasmazellige Infiltration) am Tumorrand nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei den Versuchstieren mit Östrogenbehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren kein eindeutiger histologischer Unterschied festgestellt werden konnte.

3.2.4.2. Beurteilung der Knochenbildung des Osteosarkoms

a) Ossifikation des Tumors im Röntgenbild

Die in Abb. 7 aufgetragene "relative Häufigkeit" des Ossifikationsgrades wurde mit Hilfe des Röntgenbildes in vier Grade unterteilt (Abb. 2A bis D).

Von den Tumoren der Versuchs- und Kontrolltiere (Tabelle 7 und 8) wurde nur der im Röntgenbild beobachtete Ossifikationsgrad = 2 (mittlere) und größer als 2 (starke Ossifikation = 3) für die statistische Auswertung berücksichtigt.

In Abb. 7 wurde nur die Prozentzahl der Tumoren mit einem Ossifikationsgrad = > 2 bezogen auf die Versuchsdauer mit und ohne Östrogenbehandlung dargestellt. Alle Transplantationsversuche mit Östrogenbehandlung bei weiblichen und männlichen Mäusen zeigen im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Unterschiede im Ossifikationsgrad des Tumors.

b) Ossifikation des Tumors mit der Silberimprägnation nach Lendrum

Die Schnitte der Osteosarkome, gefärbt nach der Silberimprägnation nach Lendrum, wurden im Lichtmikroskop untersucht und in die drei Ossifikationstypen eingeteilt. Die "relative Häufigkeit" der einzelnen Ossifikationstypen, aufgeteilt nach dem Tumoralter wurde in Abb. 8 für männliche und weibliche Mäuse graphisch in Säulen dargestellt. Die Unterschiede zwischen Östrogen-behandelten und Kontrolltieren in der Häufigkeit der einzelnen Ossifikationstypen sind nicht signifikant.

3.2.5. Lymphatisches Gewebe (makroskopisch und histologisch)

3.2.5.1. Lymphknoten

Von allen untersuchten 242 Mäusen zeigten nur 16 Mäuse

eine makroskopische Veränderung, eine Vergrößerung des Halslymphknotens bei zwei Tieren und des Leistenlymphknotens bei 15 Tieren. Die 16 Mäuse gliederten sich in 11 mit Östrogen behandelte (4 männliche und 7 weibliche) und in 5 Kontrolltiere (3 männliche und 2 weibliche) auf. Histologisch ließ sich bei diesen Lymphknoten nur eine Vergrößerung der Follikel mit großen hellen Zentren erkennen. Da aber die Anzahl der veränderten Lymphknoten im Vergleich zur untersuchten Mäusezahl sehr gering ist, kann diese Beobachtung nicht bewertet werden.

3.2.5.2. Thymus und Milzuntersuchung

Die makroskopischen und histologischen Untersuchungen des Thymus ergaben deutliche Unterschiede zwischen Estradurin-behandelten Mäusen und Kontrolltieren. Die Östrogenbehandlung wirkte sich in folgender Weise auf den Thymus aus:

1. Kleiner zurückgebildeter Thymus von gelblicher Farbe und verhärteter Konsistenz im Vergleich zu den Kontrolltieren.
2. Histologisch zeigte sich eine Thymusatrophie durch den teilweisen Verlust der Thymusrinde.

An den Milzen der Versuchstiere ließen sich makroskopisch und histologisch keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen finden.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

An einer Transplantatlinie eines Ra-224-induzierten Osteosarkoms sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, den wachsenden Tumor hormonell zu beeinflussen. Der Ausgangspunkt für die durchgeführten Versuche war eine Arbeit von Nilsson und Rönnbäck (1973). Sie fanden bei einer kombinierten Östrogen-Strontium-90 Behandlung vermehrt osteoklastische Osteosarkome im Vergleich zur Sr-90 Behandlung; obwohl das Östrogen anfangs eine endosteale Knochenneubildung im Femur der behandelten Mäuse erzeugte. Durch dieses Ergebnis entstand die Frage, inwieweit die histologische Differenzierung und die Fähigkeit zur Knochenbildung eines Osteosarkoms direkt durch Östrogen beeinflußbar sind.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß Östrogen dosisabhängig auch wachstumshemmend und außerdem immunsuppressiv wirkt (Budy et al., 1952; Kotani et al., 1974; Shai und Wallach, 1973 und Thompson et al., 1966). Die Immunsuppression könnte zusätzlich das Tumorwachstum begünstigen.

Die in der vorliegenden Arbeit transplantierten Osteosarkome zeigten in der Angangsrate keinen sicheren Unterschied zwischen Östrogen-behandelten und Kontrollmäusen. Im übrigen war auch allgemein zwischen weiblichen und männlichen Tieren kein Unterschied in der Angangsrate nachweisbar.

Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen fanden Nilsson und Rönnbäck (1973) bei der Induktion des Osteosarkoms durch kombinierte Östrogen-Strontium-90 Behandlung eine höhere Tumorinzidenz in einem kürzeren Zeitabstand als bei Sr-90 Behandlung allein. Dieses Phänomen erklärten sie durch den stimulierenden Effekt des Östrogens:

1. Auf die Knochenzellen und die damit vergrößerte Osteoblastenpopulation.

2. Auf die durch Sr-90 Behandlung in ihrer Funktion gestörten und morphologisch atypischen Knochenzellen.

Die Größe des Tumorvolumens und das daraus geschätzte Wachstumstempo des hier transplantierten Osteosarkoms sind offensichtlich nicht durch Östrogengabe zu verschiedenen Versuchszeiten beeinflußbar. Das heißt, daß die in vitro bei Osteosarkomlinien beobachtete wachstumsdepressive Wirkung und die Hemmung der DNS-Synthese (Scranton et al., 1975) bei diesem Tumor nicht auftritt. Zum anderen begünstigt auch die angenommene Immunsuppression und der stimulierende Effekt des Östrogens auf Osteoblasten oder osteoblastenähnlichen Tumorzellen das Wachstum des Tumors nicht.

Bei den männlichen Tumorträgern wurden unter Östrogenbehandlung häufiger Metastasen gesehen. Dieser Effekt war aber statistisch nicht zu sichern.

Faßt man aber alle männlichen und weiblichen Tiere zusammen, so ist die Metastasierung bei den männlichen signifikant häufiger. Bei unbehandelten Transplantatträgern früherer Laborversuche war dieser Unterschied statistisch nicht zu sichern. Mit zunehmendem Alter und zunehmendem Volumen des Tumors steigt auch die Anzahl der Metastasen. So fanden Kalenak und Rogers (1972) ab dem 45. Tag nach der Tumortransplantation bei allen Mäusen makroskopisch sichtbare Metastasen. Dagegen beobachtete Shimokawa (1974) ab dem 40. Tag nur bei 21% seiner Mäuse Metastasen.

Das für diese Arbeit verwendete transplantable, osteoblastische Osteosarkom besitzt seit 70 Generationen die gleiche zelluläre Differenzierung und die Fähigkeit der Knochenbildung (Strubel, 1979). Nach

Behandlung dieses Osteosarkoms mit Östrogen zeigten sich in den histologischen Untersuchungen keine Unterschiede zu unbehandelten Tumoren. Es konnte sowohl bei den Tumoren der behandelten wie unbehandelten Mäuse nur wenige Osteoklasten gesehen werden. Dies wurde auch histochemisch durch eine sehr geringe saure Phosphataseaktivität in den untersuchten Tumoren bestätigt.

Auch bei der Beurteilung der Knochenbildung des Tumors mit Hilfe des Röntgenbildes und der Silberimprägnation nach Lendrum ließen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen Östrogen-behandelten und Kontrolltieren feststellen. Ein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tumorträgern konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Nilsson und Rönnbäck (1973) dagegen fanden bei der Osteosarkominduktion durch kombinierte Östrogen-Strontium-90 Behandlung eine relativ erhöhte Zahl von osteoklastischen Osteosarkomen. Bei der Gabe von Sr-90 allein entstanden nur osteo- oder fibroblastische Osteosarkome. Östrogen kann nur die Histodifferenzierung des Osteosarkoms während der Induktion beeinflussen. Das wachsende Osteosarkom ist durch Östrogen in seinem Gewebs- und Zellbild offensichtlich nicht mehr zu verändern.

Die Wirkung des Östrogens auf das lymphatische System zeigte sich nur am Thymus sehr deutlich und entspricht den Literaturbefunden. Diese nach Östrogenbehandlung in der Literatur beschriebene Immunsuppression (Kotani et al., 1974; Thompson et al., 1966) hatte offensichtlich keine bedeutende Auswirkung auf die Tumorangangsrate, das Wachstumstempo und die Metastasierung des hier transplantierten Osteosarkoms.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ein osteoblastisches Osteosarkom aus verschiedenen Transplantatgenerationen wurde intramuskulär weiblichen und männlichen Mäusen transplantiert. Der Beginn der Östrogenbehandlung (1,5 mg Estradurin) war 2 Tage vor, 1 Tag und 14 Tage nach der Transplantation.

Nach einer Versuchsdauer von 14, 28 und 42 Tagen wurde der Einfluß von Östrogen auf Angangsrate, Tumorvolumen, Metastasenbildung, Histomorphologie und Ossifikation des Osteosarkoms geprüft. Das lymphatische Gewebe der Empfängermäuse wurde mituntersucht.

Es konnte zu keinem Versuchszeitpunkt eine Wirkung des Östrogens auf Tumorangang, Tumorgröße, histologische Differenzierung und Ossifikation beobachtet werden.

Nur die Metastasenbildung zeigte bei den männlichen Tieren nach Östrogengabe einen Unterschied, der aber nicht signifikant war. Ein signifikanter Unterschied in der Metastasenhäufigkeit war zwischen allen männlichen und weiblichen Tieren des Experimentes festzustellen. Mit steigendem Alter und Größe des Tumors nahm die Zahl der Metastasen zu.

Wie aus der Literatur bekannt, reagierte das lymphatische System auf Östrogen nur mit einer Involution der Thymusrinde.

Summary

An osteosarcoma from different transplant generations was transplanted into the muscle of male and female mice. The treatment with estrogen (1,5 mg Estradurin) was started two days before and one day and 14 days after transplantation.

After 14, 28 and 42 days the influence of estrogen of the tumor take, tumor volume, metastasis, histomorphology and ossification of the tumor was investigated and in addition the lymphatic tissue of the recipient mice.

During the whole experiment no effect of estrogen on the tumor take, tumor size, histological differentiation and ossification could be demonstrated.

Only the development of metastases of the male mice showed some difference after estrogen treatment, which was statistically not significant. A significant difference of frequence of metastases was detectable between all male and female mice of the experiment. With increasing age and size of the tumor the number of metastases increased.

The lymphatic system reacted to estrogen only with an involution of the cortical area of thymus.

TABELLE 1

METASTASENBILDUNG BEI TRANSPLANTABLEN OSTEOSARKOMEN DER MAUS

Transpl. Tumorlinie (Entstehung)	Mäuse-stamm	Art der Trpl.	Ort der Meta-stasierung	Zeit nach der Transplantation	Autor
BF-, Gardner-Osteosarkom (spontan)	CBA	s.c.	Lunge	Tod nach 6 bis 8 Wochen	Amitani et al. (1974)
Osteosarkom ab der 7. Generation (spontan)	CH3	s.c.	Lunge Lymph-knoten	Befund bei der Ob-duktion	Barrett et al. (1944)
Dunn Osteosarkom (spontan)	CH3	s.c. i.m.	Lunge	Tod nach ca. 6 Wochen	Friedman und Finsterbush (1972)
C3H/Hes Osteosarkom (spontan)	C3H	s.c.	Lunge	Tod nach 8 bis 10 Wochen	Kalenak und Rogers (1972)
Gardner-Osteosarkom 519 (Röntgen-strahlen)	CBA x C57B/6F_1	s.c.	Lunge	Befund bei der Obduktion bei 21% der Mäuse, die älter als 40 Tage waren	Shimokawa (1974)
TV-Osteo-sarkom (Ra-224)	NMRI	s.c. i.m.	Leber Lunge Milz	Befund bei der Ob-duktion	Strubel (1979)
Osteosarkom (Strontium-90)	CBA	s.c.	Leber Lunge Abdomen	Befund bei der Obduktion nach 8 Wochen	Nilsson und Ullberg (1962)
Osteosarkom C22LR (Bestrah-lung)	(CBA/RIJ xC57/BL/RIJ)F_1	i.v.	Lunge	Versuchsende am 15. Tag	van Putten et al. (1975)

TABELLE 2

ARBEITSPLAN

	Versuchs-Nr.	N	N_{Ko}	Beginn der Östrogenbehandlung	Versuchsdauer
Teil I	Versuch 1-4	100	60	1 Tag nach der Transplantation	28 Tage
Teil II	Versuch 5-6	60	32	14 Tage nach der Transplantation	42 Tage
Teil III	Versuch 7-8	40	20	2 Tage vor der Transplantation	14 Tage

N = Anzahl der mit Östrogen behandelten männlichen und weiblichen Mäuse

N_{Ko} = Anzahl der Kontrolltiere, d.h. keine Östrogenbehandlung

TABELLE 3

VERSUCHSSCHEMA 1 - TEIL I (Versuch 1 bis 4)

Versuch 1-4	Östrogenbehandlung	Versuchsdauer
Gruppe 1	1 Tag nach der Transplantation 1 mg Estradurin	28 Tage
Gruppe 2	1 Tag nach der Transplantation 1 mg und nach 7 Tagen 0,5 mg Estradurin	28 Tage
Gruppe 3	1 Tag nach der Transplantation 0,5 mg, 7 Tage danach 0,5 mg und nach 14 Tagen nochmals 0,5 mg Estradurin	28 Tage
Gruppe 4	Kontrolltiere, d.h. keine Estradurinbehandlung nach der Transplantation	28 Tage

TABELLE 4

VERSUCHSSCHEMA 2 -TEIL II (Versuch 5 und 6) und
TEIL III (Versuch 7 und 8)

TEIL II	Tumorherkunft ⁎	N	N_{Ko}	Versuchsdauer	Östrogenbehandlung
Vers. 5	TV 123/442 = 32.Generation	30	16	42 Tage	14, 21 und 28 Tage nach der Tumortransplantation Behandlung mit 0,5 mg Estradurin
Vers. 6	TV 128/446 = 32.Generation	30	16	42 Tage	Estraduringabe wie in Versuch 5
TEIL III					
Vers. 7	TV 134/451 = 34.Generation	20	10	14 Tage	2 Tage vor der Transplantation mit 1 mg und 5 Tage danach mit 0,5 mg Estradurin behandelt
Vers. 8	TV 133/450 = 34.Generation	20	10	14 Tage	Estraduringabe wie in Versuch 7

⁎ Tumorherkunft siehe Tabelle 6
N = Anzahl der mit Östrogen behandelten männlichen und weiblichen Mäuse
N_{Ko} = Anzahl der weiblichen und männlichen unbehandelten Kontrollmäuse

TABELLE 5

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE: TUMORVOLUMEN

weibliche Mäuse

	N	Vol > 0	Vol > 1	Beginn der Östrogenbeh.	N_{Ko}	Vol > 0	Vol > 1	Versuchsdauer
Teil I	48	20	20	1 Tag nach Transpl.	30	11	12	28 T.
Teil II	30	6	11	14 Tage nach Transpl.	15	1	9	42 T.

männliche Mäuse

Teil I	50	17	26	1 Tag nach Transpl.	30	10	15	28 T.
Teil II	26	5	14	14 Tage nach Transpl.	16	3	9	42 T.
Teil III	40	36		2 Tage vor Transpl.	20	17		14 T.

N = Anzahl der mit Östrogen behandelten Mäuse
N_{Ko} = Anzahl der unbehandelten Kontrollmäuse

TABELLE 6

TUMORSTAMMBAUM

Generation	RHA-25/125 (3.5.1973)					
1	TV 1					
21	TV 73					
22	TV 76					
23	TV 81			TV 83		
24	TV 85			TV 88		
25	TV 90			TV 97		TV 98
26	TV 99			TV 101		TV 103
27	TV 105	TV 104		TV 107		TV 110
28	TV 111	TV 112	=Versuch-1	TV 113	Versuch-2	TV 115
29	TV 116	TV 117		TV 121	= Versuch-3	TV 122 Versuch
30	TV 120			TV 124		TV 125
31	TV 123			TV 128		TV 126
32	TV 127	= Versuch-5		TV 130	Versuch-6	TV 129
33	TV 131			TV 133		TV 132
34	TV 134	= Versuch-7		TV 137	Versuch-8	TV 135
35	TV 138			TV 142		TV 140
36	TV 143			TV 145		TV 147

TV = Tumortransplantationsversuch
RHA-25/125 = Primärtumor

Herkunft und Abstammung des transplantablen Osteosarkoms für den experimentellen Teil. Darstellung der drei Tumorlinien.

TABELLE 7

♂ Mäuse mit Östrogenbehandlung

Versuch	mg Östr.	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	Vol = 0	Vol > 0	Vol > 1	Ossif. => 2
1	1	98	28	5	-	-	5	3
1	1,5	98	28	5	-	1	4	3
1	1,5	105	28	5	-	2	3	2
2	1	78	28	5	1	3	1	4
2	1,5	78	28	5	2	2	1	3
2	1,5	77	28	5	-	4	1	4
3	1,5	124	28	5	-	1	4	4
4	1	86	28	5	1	-	4	1
4	1,5	85	28	5	3	2	-	2
4	1,5	85	28	5	-	2	3	1
Σ	1-1,5	77-124	28	50	7	17	26	27
5	1,5	117-131	42	13[X]	2	1	10	4
6	1,5	152-170	42	13[X]	5	4	4	7
Σ	1,5	117-170	42	26[X]	7	5	14	11
7	1,5	96-100	14	20	2	18	-	-
8	1,5	100-104	14	20	2	18	-	10
Σ	1,5	96-104	14	40	4	36	-	10

N = Anzahl der Mäuse am Versuchsende
X = Je zwei Mäuse mit Tumor während des Versuches gestorben

♂ Kontrolltiere

Versuch	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	Vol = 0	Vol > 0	Vol > 1	Ossif. => 2
1	98	28	8	1	4	3	3
2	71-77	28	8	1	4	3	4
3	120	28	5	1	1	3	2
4	85-96	28	9	2	1	6	3
Σ	71-120	28	30	5	10	15	12
5	117-121	42	7[X]	2	1	4	2
6	131-150	42	9	2	2	5	6
Σ	117-150	42	16	4	3	9	8
7	95-98	14	10	2	8	-	-
8	98	14	10	1	9	-	5
Σ	95-98	14	20	3	17	-	5

N = Anzahl der Mäuse am Versuchsende
X = Eine Maus mit Tumor während des Versuches gestorben

Trpl. = Transplantation

TABELLE 8

♀ Mäuse mit Östrogenbehandlung

Versuch	mg Östr.	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	Vol = 0	Vol > 0	Vol > 1	Ossif. => 2
1	1	98	28	5	-	-	5	3
1	1,5	98	28	4[x]	-	4	-	2
1	1,5	105	28	5	-	2	3	4
2	1	85	28	5	1	3	1	4
2	1,5	85	28	5	-	4	1	5
2	1,5	85	28	4[xx]	1	2	1	3
3	1,5	128	28	5	2	2	1	3
4	1	99	28	5	2	-	3	1
4	1,5	99	28	5	1	1	3	2
4	1,5	99	28	5	1	2	2	3
Σ	1-1,5	85-128	28	48	8	20	20	28
5	1,5	131-132	42	15	3	2	10	3
6	1,5	111-112	42	15	10	4	1	5
Σ	1,5	111-132	42	30	13	6	11	8

N = Anzahl der Mäuse am Versuchsende
x = eine Maus mit Tumor während des Versuches gestorben
xx = eine Maus ohne Tumor während des Versuches gestorben

♀ Kontrollmäuse

Versuch	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	Vol = 0	Vol > 0	Vol > 1	Ossif. => 2
1	87	28	8	1	3	4	4
2	85	28	8	2	4	2	4
3	108	28	5	1	3	1	4
4	98-119	28	9	3	1	5	2
Σ	83-119	28	30	7	11	12	14
5	131	42	7	2	-	5	1
6	108	42	8	3	1	4	3
Σ	108-131	42	15	5	1	9	4

N = Anzahl der Mäuse am Versuchsende

Trpl.- = Transplantation

TABELLE 9

TUMORANGANG UND METASTASIERUNG BEI MÄNNLICHEN MÄUSEN

a) Mäuse mit Östrogen behandelt (Alter u.Versuchsdauer in Tagen)

Versuch	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	n	n_m
1	98-105	28	15	15	4
2	77-78	28	15	12	1
3	124	28	5	5	3
4	85-86	28	15	11	5
$\sum$	77-124	28	(50)	(43)86%	(13)30%
5	117-131	42	15[x]	13	6
6	152-170	42	15[x]	10	4
$\sum$	117-170	42	(30)	(23)76%	(10)43%
7	96-100	14	20	18	-
8	100-104	14	20	18	-
$\sum$	96-104	14	(40)	(36)90%	-

[x] = je 2 Mäuse mit Tumor gestorben

b) Kontrolltiere = nicht behandelt

Versuch	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	n	n_m
1	98	28	8	7	2
2	71-77	28	8	7	-
3	120	28	5	4	2
4	85-96	28	9	7	1
$\sum$	71-120	28	(30)	(25)83%	(5)20%
5	117-121	42	8[x]	6	1
6	131-150	42	9	7	2
$\sum$	117-150	42	(17)	(13)76%	(3)23%
7	95-98	14	10	8	-
8	98	14	10	9	-
$\sum$	95-98	14	(20)	(17)85%	-

[x] = eine Maus mit Tumor gestorben
N = Anzahl der Mäuse zu Beginn des Versuches
n = Anzahl der Mäuse mit Tumor
n_m = Anzahl der Mäuse mit Metastasen

TABELLE 10

TUMORANGANG UND METASTASIERUNG BEI WEIBLICHEN MÄUSEN

a) Mäuse mit Östrogen behandelt (Alter u.Versuchsdauer in Tagen)

Versuch	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	n	n_m
1	98-105	28	15^{x}	15	-
2	85	28	15^{xx}	12	-
3	128	28	5	3	-
4	99	28	15	11	-
$\sum$	85-128	28	(50)	(41)82%	-
5	111-112	42	15	12	3
6	131-132	42	15	5	-
$\sum$	111-132	42	30	(17)56%	(3)17%

^{x} = eine Maus mit Tumor gestorben
^{xx} = eine Maus ohne Tumor gestorben

b) Kontrolltiere = nicht behandelt

Versuch	Alter bei Trpl.	Vers. dauer	N	n	n_m
1	87	28	8	7	-
2	85	28	8	6	-
3	108	28	5	4	-
4	98-119	28	9	6	-
$\sum$	85-119	28	(30)	(23)76%	-
5	131	42	7	5	1
6	108	42	8	5	1
$\sum$	108-131	42	(15)	(10)86%	(2)20%

N = Anzahl der Mäuse zu Beginn des Versuches
n = Anzahl der Mäuse mit Tumor
n_m = Anzahl der Mäuse mit Metastasen
Trpl. = Transplantation

TABELLE 11

Östrogenbehandlung							Kontrollen					
N	Vers. dauer (Tage)	Geschlecht	n	Anzahl der Fälle mit Metastasen			N	Vers. dauer (Tage)	Geschlecht	n	Anzahl der Fälle mit Metastasen	
				Leber	Lunge	Milz					Leber	Lunge	Milz
43	28	männl.	13	12	1	1	25	28	männl.	5	5	1	–
40	28	weibl.	0	–	–	–	23	28	weibl.	0	–	–	–
19	42	männl.	10	10	1	1	12	42	männl.	3	3	1	–
17	42	weibl.	3	3	1	–	10	42	weibl.	2	2	–	–
36	14	männl.	0	–	–	–	17	14	männl.	0	–	–	–

N = Anzahl der untersuchten Mäuse mit einem transplantierten Tumor

n = Anzahl der Mäuse mit Metastasen

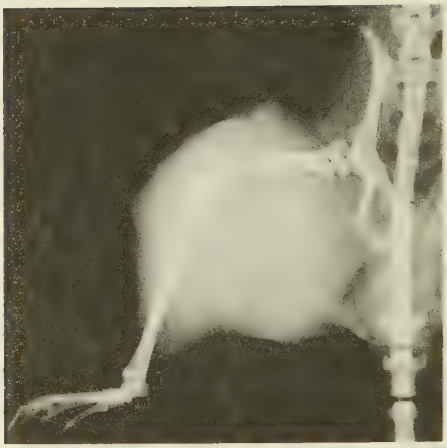

Abb. 2A

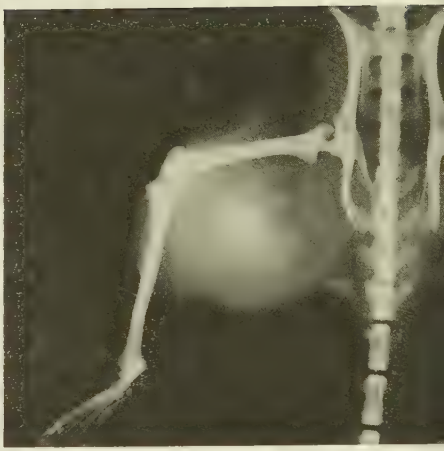

Abb. 2B

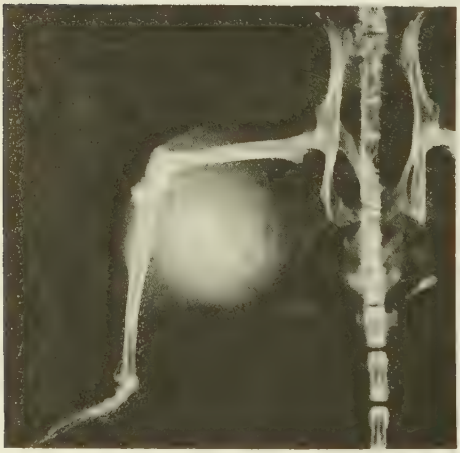

Abb. 2C

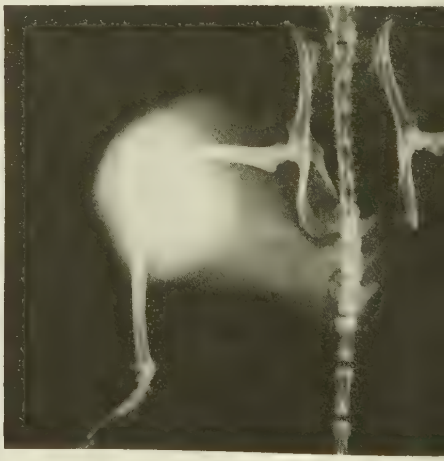

Abb. 2D

Abbildungen 2A bis D zeigen die 4 Ossifikationsgrade an Tumoren in den rechten Hinterbeinen von NMRI-Mäusen.

Abb. 2A Ossifikationsgrad = 0 (Kontrollmaus)
Abb. 2B Ossifikationsgrad = 1 (Versuchsmaus)
Abb. 2C Ossifikationsgrad = 2 (Kontrollmaus)
Abb. 2D Ossifikationsgrad = 3 (Versuchsmaus)

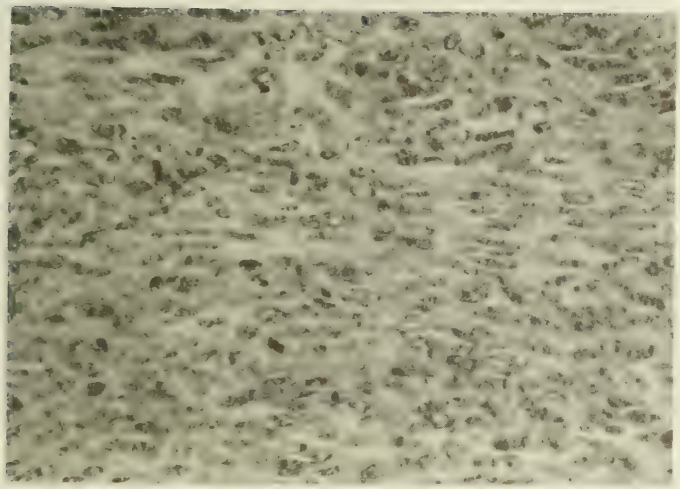

Abb. 3A Bild eines polymorphzelligen Osteosarkomabschnittes mit spindeligen Zellen. Vergr. 300fach.

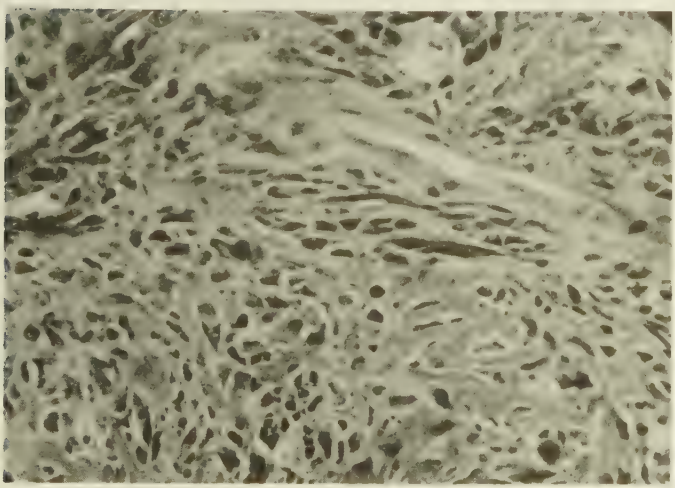

Abb. 3B Bild eines Osteosarkomteils mit osteoblastenähnlichen Zellen. Vergr. 300fach.

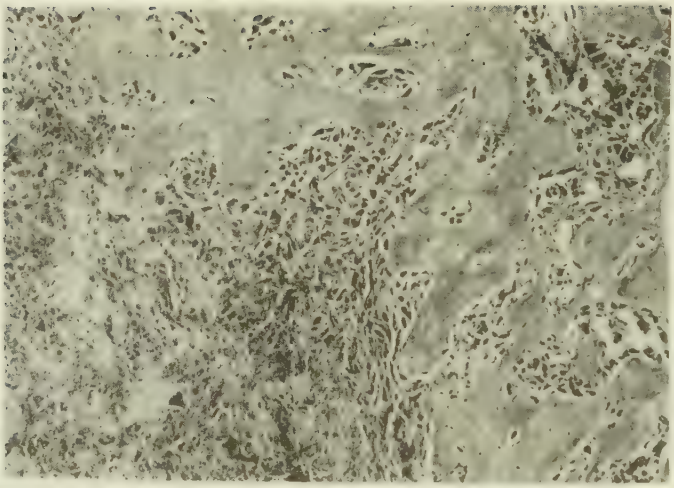

Abb. 3C Bild eines osteoblastischen Osteosarkoms mit starker Ossifikation. Vergr. 125fach.

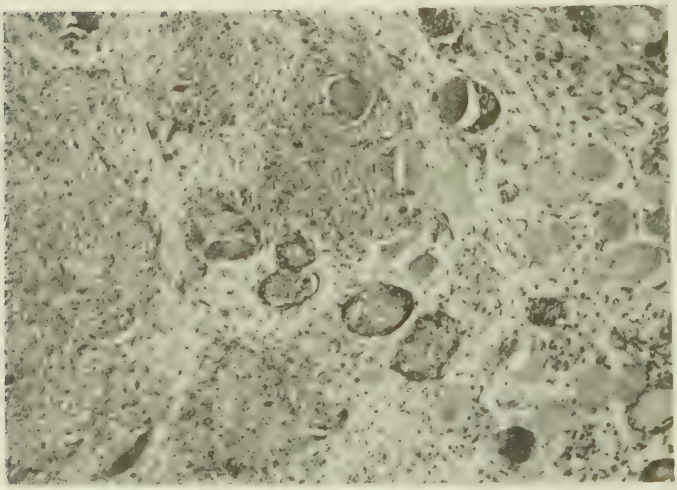

Abb. 4 Infiltration der quergestreiften Muskulatur durch ein Osteosarkom. Vergr. 125fach.

Abb. 5

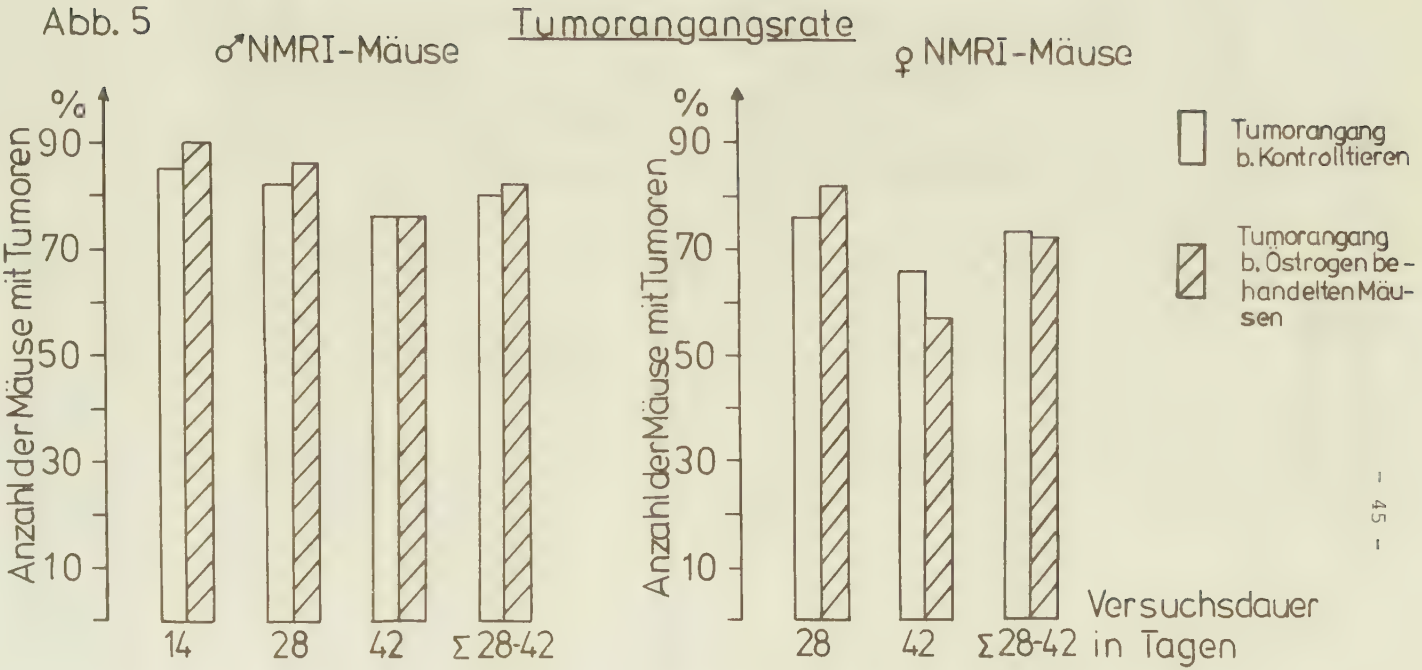

Abb. 5: Die Angangsrate des transplantablen Osteosarkoms wurde prozentual zur Anzahl der mit Östrogen behandelten und unbehandelten Mäuse zu Versuchsbeginn = 100% aufgetragen. Die gestorbenen Tiere wurden in der Tumorangangsrate berücksichtigt. Die Anzahl der untersuchten Mäuse mit Tumoren sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt.

Abb.6 Wachstumsgeschwindigkeit

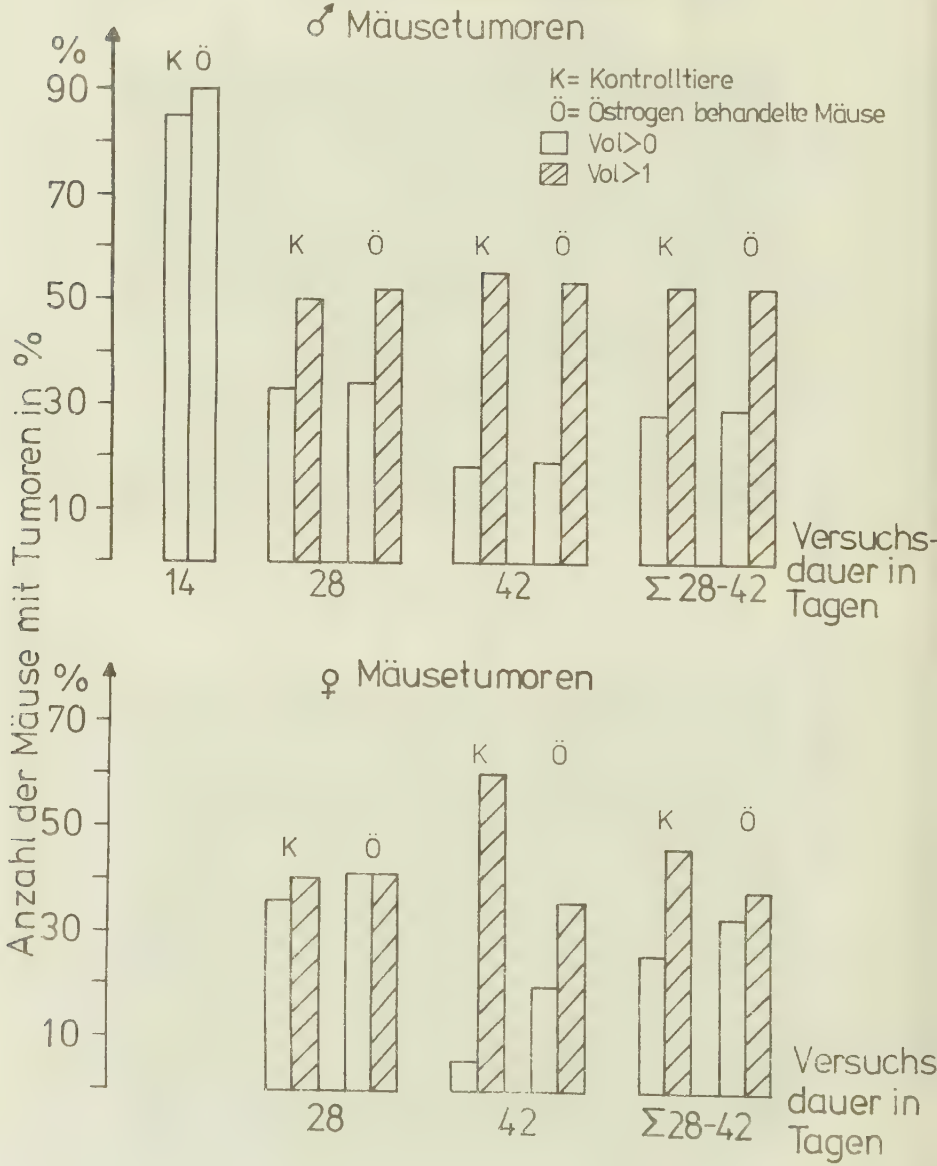

Abb. 6: Die Wachstumsgeschwindigkeit des Osteosarkoms mit verschiedenem Tumoralter wurde aus dem Tumorvolumen (Vol >0 und Vol >1) errechnet, und prozentual zur Gesamtzahl der mit Östrogen behandelten (Ö) und unbehandelten (K) Mäuse aufgetragen. Die gestorbenen Tiere wurden nicht berücksichtigt. Anzahl der beurteilten Tumoren in Tabellen 7 und 8 dargestellt.

Abb.7 Ossifikation des Osteosarkoms nach Röntgenbildern

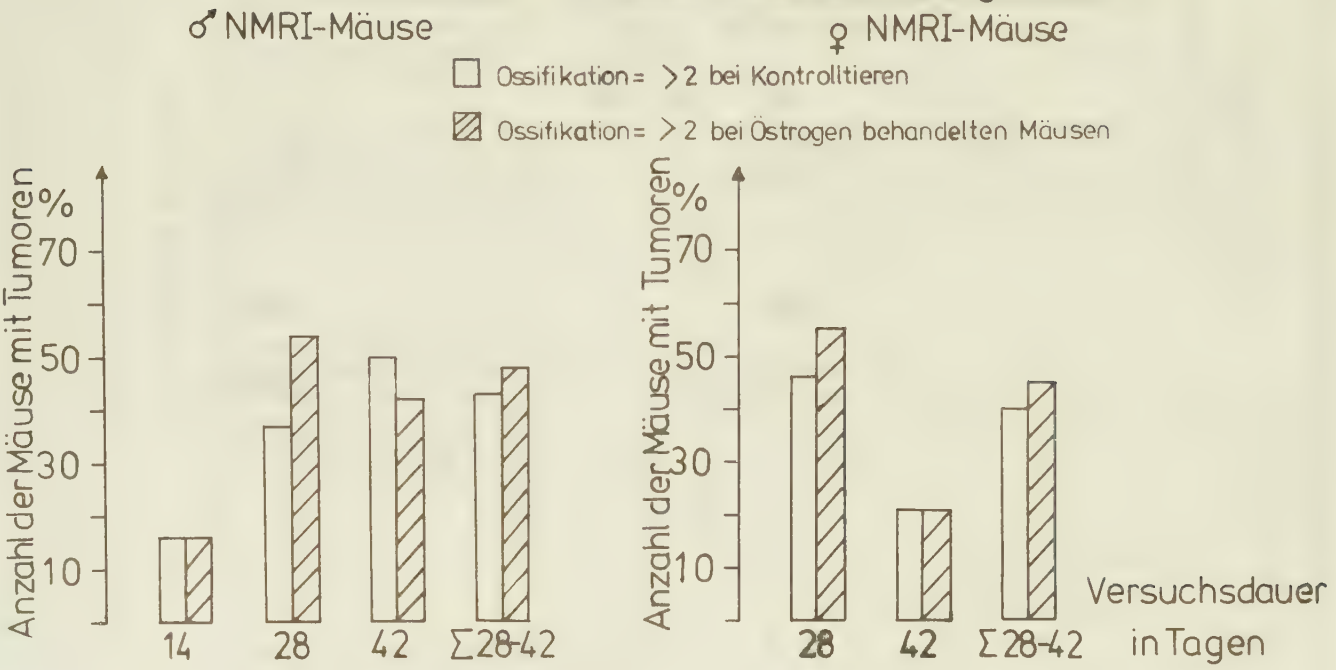

Abb. 7: Die Ossifikation des transplantablen Osteosarkoms wurde mit Hilfe des Röntgenbildes bestimmt und prozentual zur Gesamtzahl der mit Östrogen behandelten und unbehandelten Mäuse aufgetragen, es wurde nur der Ossifikationsgrad => 2 gewertet. Die gestorbenen Tiere wurden hier nicht berücksichtigt. Die Anzahl der beurteilten Tumoren sind in Tabelle 7 und 8 zusammengestellt.

Abb.8 Klassifikation der Tumoren aufgrund des Ossifikationsbildes nach Silberimprägnation

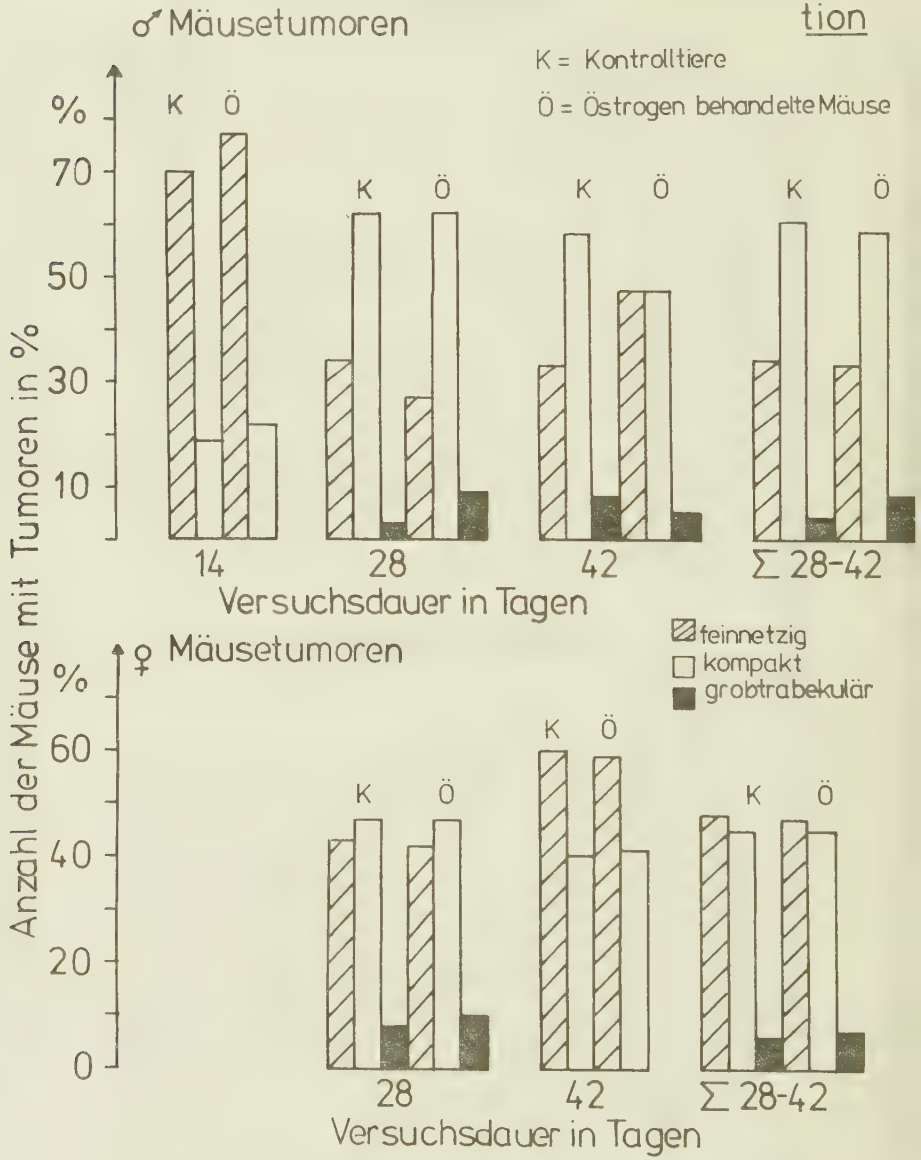

Abb. 8: Die Ossifikation des transplantablen Osteosarkoms wurde mit Hilfe der Silberimprägnation nach Lendrum histologisch klassifiziert und die Tumorknochenstruktur in 3 Stufen eingeteilt (feinnetzige, kompakte und grobtrabekuläre). Die verschiedenen Ossifikationstypen wurden prozentual zur Gesamtzahl der mit Östrogen behandelten (ö) und unbehandelten (K) Mäuse aufgetragen.

Abb.9 Metastasen im Vergleich zum Tumorvolumen

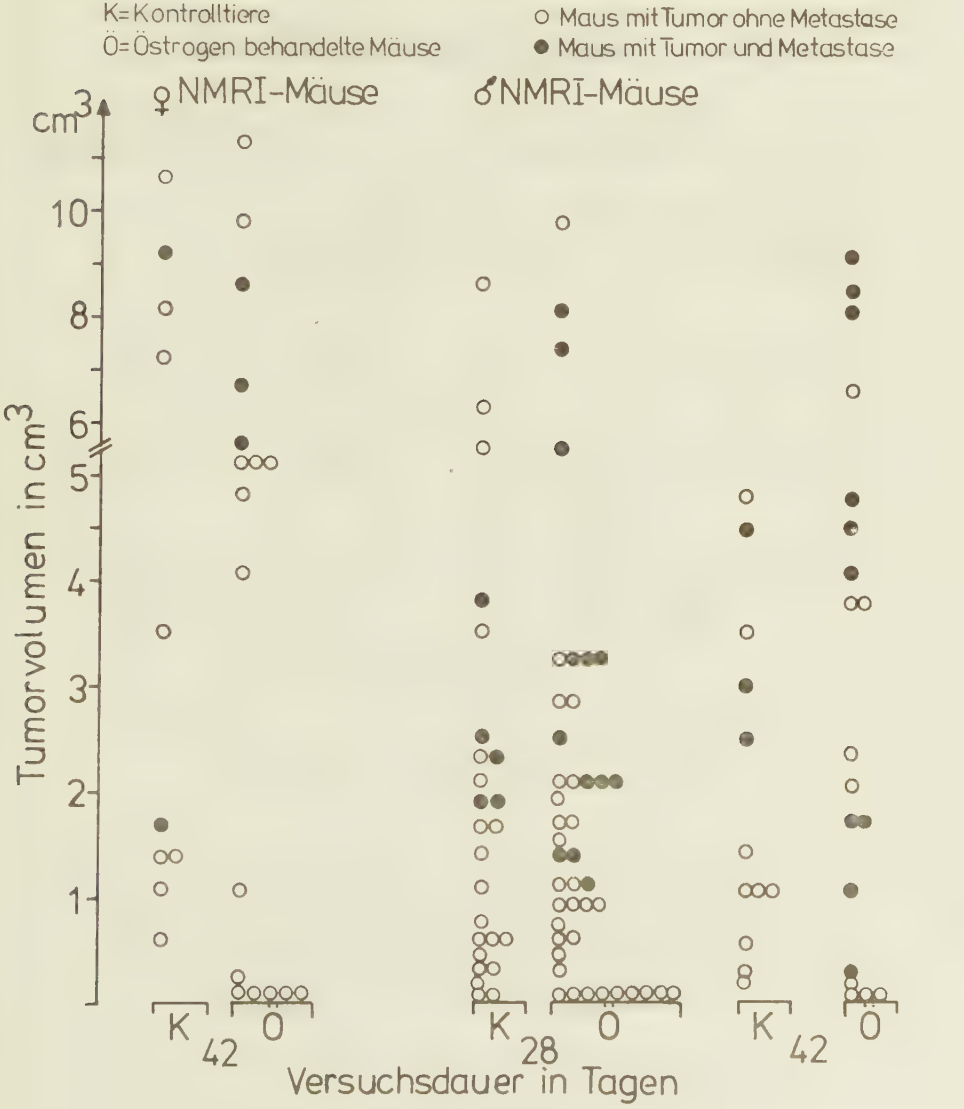

Abb. 9: Die Anzahl der Mäuse mit Tumoren ohne Metastasen und Mäuse mit Tumoren und Metastasen aus unterschiedlichen Versuchszeiten wurden im Vergleich zum Tumorvolumen aufgetragen für Kontrollen und Östrogen-behandelte Tiere.

Abb.10 Verteilung der Metastasen

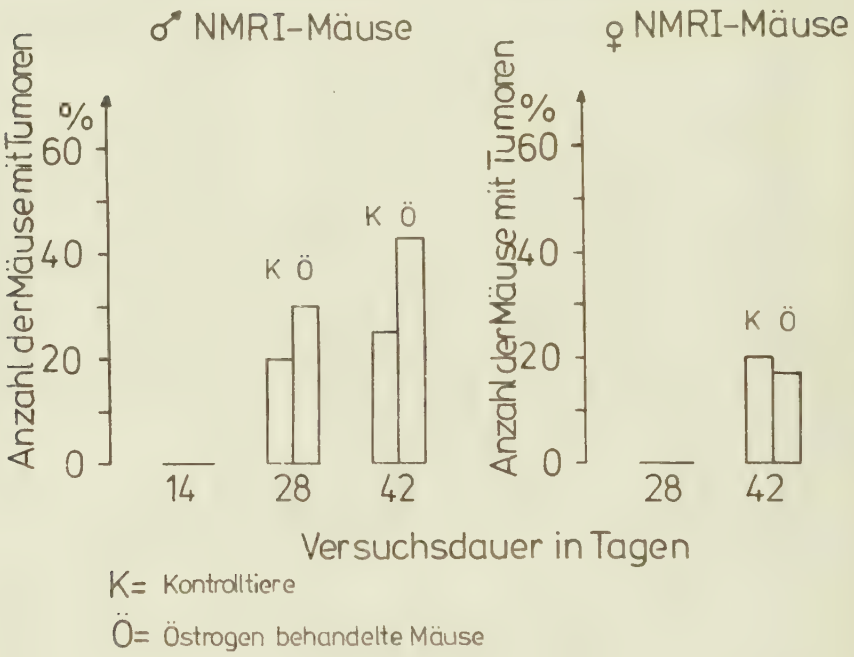

Abb. 10: Die "relative Häufigkeit" der Metastasen, in Tabelle 11 zusammengestellt, wurde im Vergleich zur Gesamtzahl der Mäuse mit Tumoren aufgetragen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Amitani, K., Nakata, Y., and Stevens, J. (1974): Bone induction by lyophilized osteosarcoma in mice. Calcif. Tiss. Res. 16, 305-313

Attia, M.A.M., and Weiss, D.W. (1966): Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. Cancer Research 26, 1787-1800

Barka, T., Anderson, P.J. (1963): Histochemistry. New York-Evanston-London: Hoeber Medical Division, Harper & Row

Barrett, M.K., Dalton, A.J., Edwards, J.E., Greenstein, J.P. (1944): A transplantable osteogenic sarcoma originating in a C3H mouse. J. Nat. Cancer Inst. 4, 389-402

Boeryd, B., and Suurküla, M. (1973): Tumour metastasis in mice with reduced immune reactivity. I. Studies with two MCA-induced sarcomas in radiation and thymectomized radiation C57 BL/6J chimeras. Int. J. Cancer 12, 722-727

Budy, A.M., Urist, M.R., and McLean, F.C. (1952): The effect of estrogens on the growth apparatus of the bones of immature rats. American J. Path. 28, 1143-1156

Burrows, H. (1935): Separation of the pubic bones following the administration of estrogens to male mice. J. Physiol. (London) 85, 159-160

Caputo, C.B., Meadows, D., and Raisz, L.G. (1976): Failure of estrogens and androgens to inhibit bone resorption in tissue culture. Endocrinology 98, 1065-1068

Chiodi, H. (1938): Influence des hormones sexuelles. In: Yearbook of the Viking Society for Northern Research - London, pp. 129-133

Clavert, J., Cabannes, R., and Grangaud, R. (1945): Enrichisement du squelette en calcium, chez le souris sous l'action du dipropionate d' oestradiol.
C.R. Soc. Biol. 139, 731-739

Corwin, J.A., and Morehead, J.R. (1971): The origin of osteoclasts in estrogen-stimulated bone resorption of the pubic symphysis of the mouse.
Anat. Rec. 171, 509-516

Dougherty, T.F. (1952): Effect of hormones on lymphatic tissue.
Physiol. Rev. 32, 379-401

Fidler, I.J. (1975): Effects of glucocorticoids (cortisone) on metastasis.
In: Cancer 4, pp. 121-122. Ed.: F.F. Becker Plenum Press, New York and London

Friedman, B., and Finsterbush, A. (1972): Investigation of a transplantable murine osteosarcoma.
In: Bone - Certain Aspects of Neoplasia, pp. 339-351. Eds.: C.H.G. Price and F.G.M. Ross Butterworths, London

Gardner, W.U. (1936): Sexual dimorphism of the pelvis of the mouse. The effect of oestrogenic hormones upon the pelvis and upon the development of scrotal hernies.
Amer. J. Anat. 59, 459-462

Gardner, W.U., and Pfeiffer, C.A. (1938): Skeletal changes in mice receiving estrogens.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 37, 678-679

Gössner, W., Hindringer, B., Luz, A., Schwabe, M. (1972): Morphologie und Enzymhistochemie ^{224}Ra-induzierter osteogener Sarkome bei der Maus.
Z. Krebsforsch. 78, 225-235

Gössner, W., Hug, O., Luz, A., and Müller, W.A. (1976): Experimental induction of bone tumors by short-lived bone-seeking radionuclides.
Recent Results in Cancer Research 54, 36-49

Gössner, W. und Schwabe, M. (1971): Enzymhistochemie des Knochengewebes.
Z. Orthop. 109, 212-230

Haines, A.L. (1957): The effect of estrogen on cartilage and bone in castrate C3H mice.
Yale J. Biol. Med. 30, 121-136

Heiple, K.G., Herndon, C.H., Chase, S.W., Wattleworth, A. (1968): Osteogenic induction by osteosarcoma and normal bone in mice.
J. Bone and Joint Surg. 50-A, 311-325

Hilberg, A.W. (1956): Morphologic variations in an osteogenic sarcoma of the mouse when transplanted to the kidney.
J. Nat. Cancer Inst. 16, 951-959

Howard, E. (1966): Effects of 17ß-estradiol on bone maturation in mice.
Steroids 7, 375-380

Jacobson, L.O. (1944): The effect of estrogens on the peripheral blood and bone marrow of mice.
Endocrinology 34, 240-244

Kalenak, A., and Rogers, C.C. (1972): A comparison of the therapeutic effect of amputation and roentgen radiation on C3H/HES osteogenic sarcoma.
J. surg. Res. 13, 289-294

Kappas, A., Jones, H.E.H., Roitt, I.M. (1963): Effects of steroid sex hormones on immunological phenomena.
Nature 198, 902

Kappas, A., and Palmer, R.H. (1963): Selected aspects of steroid pharmacology.
Pharmacol. Rev. 15, 123

Klein, E. (1965): Tumor-specific transplantation antigens.
In: Immunopathology (IVth International Symposium, Monte Carlo), pp. 13-22.
Schwabe & Co., Basel, Stuttgart

Kotani, M., Nawa, Y., Fujii, H. (1974): Inhibition by testosterone of immune reactivity and of lymphoid regeneration in irradiated and marrow reconstituted mice.
Experientia 30, 1343-1345

Lindquist, B., Budy, A.M., McLean, F.C., Howard, J.L. (1960): Skeletal metabolism in estrogen-treated rats studied by means of Ca-45.
Endocrinology 66, 100-111

Marks Jr., S.C., and Walker, D.G. (1976): The induced osteopetroses.
In: The Biochemistry and Physiology of Bone. Vol. IV. 2nd edition, Calcification and Physiology, pp. 280-282. Ed.: G.H. Bourne Academic Press, New York and London

Marquart, K.-H., Luz, A., Gössner, W. (1974): Zur Ultrastruktur des strahleninduzierten Osteosarkoms der Maus.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 58, 434-437

McLean, F.C., Urist, M.R. (1968): Bone.
Univ. Chicago Press, Chicago, Illinois

Miller, E.W., Orr, J.W., and Pybus, E.C. (1943): The effect of oestron on mouse skeleton with particular reference to the Newcastle bone tumor (NBT) strain.
J. Path. Bact. 55, 137-145

Money, W.L., Fager, J., and Rawson, R.W. (1952): The comparatice effects of various steroids on lymphoid tissue of the rat.
Cancer Res. 12, 206-210

Mori, M., Ito, M., and Fukui, S. (1965): Decalcification for histochemical demonstration of hydrolytic and oxidative enzymes.
Histochemie 5, 185-195

Müller, W.A., Gössner, W., Hug, O., and Luz, A. (1978): Late effects after incorporation of the short-lived α-emitters Ra-224 and Th-227 in mice.
Health Physics 35, 33-55

Murphy, E.D. (1966): Characteristic Tumors.
In: Biology of the Laboratory Mouse. Ed. 2, pp. 521-562. Ed.: E.L. Green
McGraw Hill & Co., New York, Toronto, Sydney, London

Nagel, A., und Geiger, Ch. (1971): Krebs und Immunität.
Schweiz. med. Wschr. 101, Nr. 45, 1605-1620

Nilsson, A. (1970): Pathologic effects of different doses of radiostrontium in mice. Dose effect relationship in Sr-90 induced bone tumors.
Acta radiol. Ther. Phys. Biol. 9, 155-159

Nilsson, A., and Rönnbäck, C. (1973): Influence of oestrogenic hormones on carcinogenesis and toxicity of radiostrontium.
Acta radiol. Ther. Phys. Biol. 12, 209-228

Nilsson, A., and Ullberg, S. (1962): Dissemination of metastases from a Strontium-90-induced transplanted osteosarcoma investigated by whole-body autoradiography.
Acta radiol. Ther. Phys. Biol. 58, 275-280

Nutik, G., and Cruess, R.L. (1974): Estrogen receptors in bone. An evaluation of the uptake of estrogen into bone cells.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 146, 265-268

Rembiesa, R., Ptak, W., and Bubak, M. (1974): The immunosuppressive effects of mouse placental steroids.
Experientia 30, 82-83

Rohr, H.P. (1964): Zur Entstehung der mehrkernigen Osteoclasten nach Parathormongabe.
Klin. Wochenschrift 42, Heft 23, 1209-1212

Sakai, T., Cruess, R.L., Yoshinari, T., and Iida, K. (1970): Effect of estrogen upon the lipids of various regions of the long bones of the rat.
Endocrinology 86, 167-171

Scranton Jr.,P.E., McMaster, J.H., and Diamond, P.E. (1957): Hormone suppression of DNA synthesis in cultured chondrocyte and osteosarcoma cell lines.
Clinical Orthop. and Relat. Res. 112, 340-348

Shai, F., and Wallach, S. (1973): Interactions of estradiol and calcitonin on the rat skeleton.
Endocrinology 93, 1044-1051

Shimokawa, K. (1974): Histological and histochemical findings of transplantable osteosarcoma of mice.
Acta Histochem. Cytochem. 7, 112-125

Silberberg, M., and Silberberg, R. (1941): The difference in the response of skeletal tissue to estrogen in mice of various age.
Anat. Rec. 80, 347-371

Silberberg, M., and Silberberg, R. (1971): Steroid hormones and bone.
In: The Biochemistry and Physiology of Bone, Vol. III. 2nd edition, Development and Growth, pp. 401-484. Ed.: G.H. Bourne
Academic Press, New York and London

Simmons, D.J. (1962): Cellular changes in the bones of mice as studied with tritiated thymidine and the effects of estrogen.
Clinical Orthop. and Relat. Res. 26, 176-189

Simmons, D.J. (1966): Collagen formation and endochondral ossification in estrogen treated mice.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 121, 1165-1168

Stewart, H.L., Snell, K.C., and Dunham, L.J. (1959): Transplantable and transmissible tumors of animals.
In: Atlas of Tumor Pathology, Section XII, Fascicle 40, pp.92-100.
Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.

Strubel, L. (1979): Persönliche Mitteilung über die TV-Osteosarkom-Transplantationslinie.

Suzuki, H.K. (1959): Synergistic effect of thyroxin and estradiol valerate on the inhibition of linear growth in the mouse femur.
Growth 23, 291-304

Thompson, J.S., Reilly, R.W., Crawford, M., and Russe, H.P. (1965): The effect of estradiol and estriol on the survival of sublethally and lethally irradiated mice.
Radiation Res. 26, 567-583

Thompson, J.S., Severson, C.D., Reilly, R.W. (1966): The effect of estradiol and irradiation on the nucleic acid metabolism of the thymus, spleen, lymph node, and liver of mice.
Radiation Res. 29, 537-548

Urist, M.R., Budy, A.M., and McLean, F.C. (1950): Endosteal-bone formation in estrogen-treated mice.
J. Bone Jt. Surg. 32-A, 143-162

van Paassen, H.C., Poortman, J., Borgart-Creutzburg, I.H.C., Thijssen, J.H.H., and Duursma, S.A. (1978): Oestrogen binding proteins in bone cell cytosol.
Calcif. Tiss. Res. 25, 249-254

van Putten, L.M. (1968): Tumour reoxygenation during fractionated radiotherapy; studies with a transplantable mouse osteosarcoma. Europ. J. Cancer 4, 183-182

van Putten, L.M., Kram, L.K.J., van Dierendonck, H.H.C., Smink, T., and Füzy, M. (1975): Enhancement by drugs of metastatic lung nodule formation after intravenous tumour cell injection. Int. J. Cancer 15, 588-595

Walker, D.G. (1973): Experimental osteopetrosis. Clinical Orthop. and Relat. Res. 97, 158-174

Herrn Prof. Dr. W. Gössner danke ich herzlich für die Überlassung des Themas.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. A. Luz für die Betreuung und jederzeit freundlich gewährte Hilfe in der GSF.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Abteilung für Pathologie, insbesondere Frau L. Strubel, die bei der technischen Ausführung der Arbeit behilflich war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin bedanke ich mich bei der GSF für die Gewährung eines Stipendiums und bei der Leo-Bastian Werke GmbH München für die Überlassung des Medikaments Estradurin.

LEBENSLAUF

Geburtsort:	Burglengenfeld
Geburtsdatum:	30. Januar 1947
Vater:	Dr. Hans Schmitt, Tierarzt
Mutter:	Dr. Charlotte Schmitt, geb. Polin prakt. Ärztin

Ausbildung

1953 - 1957:	Kath. Volksschule in Köfering und Mellrichstadt
1957 - 1958:	Hum. Gymnasium Münnerstadt
1958 - 1967:	Armin-Knab Gymnasium Kitzingen Abschluß: Abitur
1967 - 1969:	18 Monate Bundeswehr
1969 - 1979:	Universität München Studium der Tiermedizin
22.11.1974:	Tierärztliches Staatsexamen
22.01.1975:	Approbation
1975 - 1979:	Promotionsstudium in der Pathologie
1.10.1977:	Eheschließung mit Elfriede Schmitt, geb. Böker